

N° D'ORDRE

264

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Serge COMBET

PREMIÈRE THÈSE

Étude de la fonction polyacide de la gélatine

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 6 Octobre 1962 devant la Commission d'examen

MM. J. SALVINIEN

Président.

C. BOUHET

E. KAHANE

G. CHAMPETIER

} Examineurs.

N° D'ORDRE

264

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Serge COMBET



PREMIÈRE THÈSE

Étude de la fonction polyacide de la gélatine

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 6 Octobre 1962 devant la Commission d'examen

MM. J. SALVINIEN

Président.

C. BOUHET

E. KAHANE

G. CHAMPETIER

} Examineurs.

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

DOYEN

B. CHARLES Mathématiques pures

ASSESEUR

R. JOUTY Physique

DOYEN HONORAIRE

P. MATHIAS Zoologie et Biologie Générale

PROFESSEURS HONORAIRES

R. JACQUES	E. TURRIERE
M. CASTERAS	J. SOULA
E. CARRIERE	G. DENIZOT

PROFESSEURS TITULAIRES

M. MOUSERON	Chimie
L. EMBERGER	Botanique
C. BOUHET	Physique
P. MATHIAS	Zoologie et Biologie générale
P. CHATELAIN	Minéralogie et cristallographie
Mlle O. TUZET	Zoologie et Biologie générale
Mlle G. CAUQUIL	Chimie
J. GRANIER	Physique
J. SALVINIEN	Chimie-physique
G. COUCHET	Mécanique supérieure
Mlle A. M. VERGNOUX	Physique
P. SILBER	Chimie Minérale
J. AVIAS	Géologie
P. VIELES	Chimie
J. RABINOVITCH	Physique
E. KAHANE	Chimie biologique
J. J. MOREAU	Mécanique rationnelle
J. MOTTE	Botanique
C. CHALIN	Physique
I. ASSENMACHER	Physiologie Animale.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mme J. CHARLES	Mathématiques
R. JACQUIER	Chimie
Mlle DE POUCQUES	Botanique
R. LAFONT	Physique
P. MURAOUR	Géophysique appliquée

MAITRES DE CONFERENCES

J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
L. EUZET	Zoologie
C. ROUMIEU	Mathématiques
J. PERRETTI	Physique
M. MATTAUER	Géologie
P. CAILLON	Physique
J. REMY	Géologie
G. TOURNE	Chimie minérale
H. ANDRILLAT	Astronomie
Mme VERNET-CORNUBERT	Biologie animale
A. BONNET	Botanique
P. DEMANGEON	Géologie
E. GROUBERT	Physique
H. CHRISTOL	Chimie
Mme LAFON	Mathématiques
J. ROUZAUD	Chimie
Mme COLSON-GUASTALLA	Biologie Physico-chimique
J. P. LAFON	Mathématiques
A. STEINER	Psycho-physiologie
G. LAMATY	Chimie
C. DELOUPY	Physique
L. GRAMBAST	Botanique
A. MARTINEAU	Mathématiques

CHARGE D'ENSEIGNEMENT

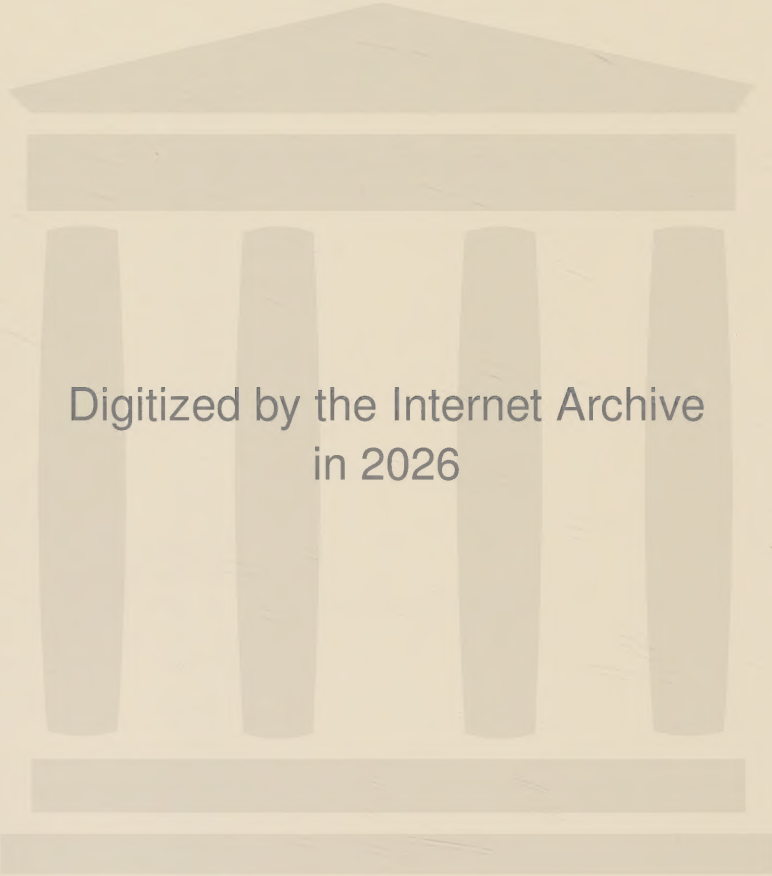
M. LEFRANC	Mathématiques
------------	---------------

SECRETAIRE PRINCIPAL

E. SIAU

A la mémoire de Jean Fize

A mes parents,
A ma femme,
A tous les miens.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

Je saisis avec empressement l'occasion qui m'est offerte de manifester à Monsieur le Professeur Salvinien ma reconnaissance pour m'avoir orienté vers la recherche en chimie-physique en m'accueillant jeune étudiant dans son laboratoire et m'avoir montré sa confiance en me proposant un sujet de recherches constituant la continuation d'une partie de sa thèse de doctorat; je le remercie de sa constante sollicitude pendant ces années de travail.

J'assure de ma sincère gratitude Monsieur le Professeur Bouhet qui, après m'avoir dispensé son enseignement, me fait l'honneur de siéger dans mon jury de thèse.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur Kahane d'avoir accepté avec une extrême complaisance de juger ce travail à la lumière de sa haute connaissance des problèmes biochimiques.

Monsieur le Professeur Champetier de la Faculté des Sciences de Paris, Membre de l'Institut, a bien voulu se joindre à ce jury malgré ses très nombreuses occupations; qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma reconnaissance pour l'honneur qu'il me fait ainsi.

Mes remerciements vont enfin à tout le personnel du laboratoire et tout spécialement à Monsieur Gaufres dont la collaboration et l'amitié m'ont été précieuses et à Mademoiselle Duchêne qui m'a particulièrement assisté dans de longs travaux analytiques avec beaucoup de compétence.

INTRODUCTION

Les protéines sont connues depuis longtemps pour posséder des fonctions acides et basiques mais l'étude quantitative des équilibres thermodynamiques correspondants n'a été abordée avec succès que vers 1924. Il faut alors citer le précurseur remarquable que fut le danois K. Linderstrøm-Lang. De nouvelles et importantes contributions sont apparues plus tard sous la signature de divers chercheurs parmi lesquels nous retiendrons les noms de R.K. Cannan, de E.J. Cohn et J.T. Edsall, de G. Scatchard et de Ch. Tanford. Comme ce travail prétend le montrer, la voie générale ainsi suivie jusqu'à l'heure actuelle et qui est finalement une adaptation de la théorie des solutions d'électrolytes simples de Debye et Hückel, n'est pas la seule possible bien que la plus largement utilisée. Et cependant la gélatine ne paraît pas avoir bénéficié de son application. Ceci est certainement dû à plusieurs causes. Tout d'abord la gélatine, produit d'hydrolyse du collagène, est classée dans le groupe de protéines du même nom et par conséquent très éloignée des protéines globulaires auxquelles s'adresse la théorie simple envisagée ci-dessus. Ensuite la préparation même de la gélatine fournit des produits différents par certaines de leurs propriétés mécaniques (comme la viscosité ou la rigidité), chimiques (comme le pouvoir sensibilisateur de l'émulsion photographique) ou électrochimiques (comme le point isoionique). Ainsi la gélatine n'apparaît pas comme une espèce chimique définie au sens le plus strict du terme alors que nous inclinons à considérer qu'il s'agit plutôt d'une sorte d'"isomérisie macromoléculaire". Ceci a sans doute contribué à diriger les travaux des physico-chimistes vers des protéines bien mieux définies qui présentent parfois des caractères de spécificité remarquables aussi bien par leur fixité à l'état natif que par leur fragilité à certaines actions chimiques. Ces caractères, qui ne sont pas encore tous bien élucidés, ont servi de refuge à la conception d'une force vitale que l'expérience de Wöhler n'a pas définitivement détruite et, pour une grande part, ont ainsi empêché la symbiose générale entre les travaux sur les protéines et ceux sur les matières plastiques ou les polyélectrolytes artificiels. Nous nous bornerons à citer parmi ces derniers ceux de W. Kühn, de A. Katchalsky, de S.A. Rice et de S. Lifson.

La gélatine, obtenue par une transformation chimique brutale à partir d'une protéine naturelle, nous semble au contraire bien adaptée pour servir de trait d'union entre ces deux domaines. Après une étude phénoménologique des diverses théories, l'application éventuelle à la gélatine sera donc envisagée. Cependant dans l'ionisation des protéines, le chevauchement partiel des dissociations des diverses espèces de groupes ionisables rend difficile une interprétation des titrages et c'est toujours sur la base de critères fixés par l'analyse des protéines que le nombre de groupes est déterminé, per-

mettant alors une étude de leurs interactions. Dans le cas des polyacides homogènes, par contre, il n'y a pas de problème stoechiométrique et les interactions des groupes sont seules intéressantes. Nous pensons que la gélatine peut *à la fois* être analysée titrimétriquement indépendamment de toute autre catégorie de renseignements et se prêter à la discussion des interactions électrostatiques. L'esprit de ce travail se trouve donc dans une utilisation systématique des possibilités des titrages électrochimiques d'une protéine.

CHAPITRE I

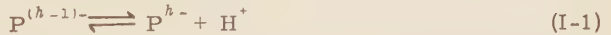
PROTÉINES ET POLYÉLECTROLYTES ASPECTS THÉORIQUES DE L'ÉLECTROCHIMIE DES SOLUTIONS

La thermodynamique des solutions de polyélectrolytes n'est qu'un cas particulier de celle des solutions d'électrolytes simples. Mais l'intervention de certaines relations de configuration spatiale entre les ions en fait pratiquement un problème plus complexe, qui n'a certainement été que partiellement résolu en dépit des nombreux travaux déjà effectués. Ceux-ci ont commencé à paraître vers 1948 et depuis l'intérêt ne s'est pratiquement pas relâché. Cependant, dès 1924 le travail de précurseur de Linderstrøm-Lang [8] a ouvert une voie très fertile dans l'étude des protéines. Celles-ci étant des polyampholytes doivent être considérées comme un cas particulier des polyélectrolytes. C'est pourquoi ce chapitre donne un aperçu des théories générales des polyélectrolytes après le cas simplifié des protéines globulaires. Bien que plusieurs revues générales traitent ce dernier sujet [1, 7], certaines variations dans le raisonnement ou le fait que ses diverses étapes sont parfois dispersées en plusieurs mémoires, nous ont conduit à reprendre entièrement le calcul.

A - THEORIE SIMPLE DES PROTEINES GLOBULAIRES

1/ Equilibres multiples dans le cas idéal

Supposons que la molécule P du polyélectrolyte possède m groupes acides et plaçons-nous dans le cas idéal où tous ces groupes sont thermodynamiquement identiques et indépendants. Si la molécule a déjà $h - 1$ groupes dissociés, les divers équilibres microscopiques, différents seulement par la répartition des groupes considérés sur la molécule et correspondant à la dissociation du $h^{\text{ème}}$ proton, de forme générale :



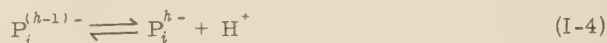
sont alors thermodynamiquement équivalents. En désignant par les symboles entre parenthèses les activités des espèces ioniques, la constante d'équilibre de cette dissociation s'écrit :

$$k_h = \frac{(P^{h-}) (H^+)}{(P^{(h-1)-})} \quad (I-2)$$

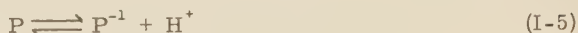
La constante de dissociation intrinsèque d'un site i quelconque est :

$$k = \frac{(P_i^{h-}) (H^+)}{(P_i^{(h-1)-})} \quad (I-3)$$

équation relative à l'équilibre suivant, où la dissociation a lieu au site i spécifié :



En partant du premier équilibre :



et en considérant tous les équilibres successifs amenant à l'équation (I-1), on montre facilement que :

$$(P^{h-}) = (P) (H^+)^{-h} \prod_{j=1}^h k_j \quad (I-6)$$

D'autre part, si C_m^h est le nombre de combinaisons de m sites par groupes de h , il y a C_m^h formes microscopiques possibles pour l'espèce P^{h-} et C_m^{h-1} formes possibles pour l'espèce $P^{(h-1)-}$. Par hypothèse, les activités de toutes les formes d'une même espèce sont égales et on a :

$$(P^{h-}) = C_m^h (P_j^{h-}) \quad (I-7)$$

$$(P^{(h-1)-}) = C_m^{h-1} (P_j^{(h-1)-}) \quad (I-8)$$

L'équation (I-2) fournit alors :

$$k_h = \frac{C_m^h}{C_m^{h-1}} \frac{(P_j^{h-})}{(P_j^{(h-1)-})} (H^+) \quad (I-9)$$

ou encore :

$$k_h = \frac{m - h + 1}{h} k \quad (I-10)$$

qui donne la valeur de la constante de dissociation à chaque étape de celle-ci, en fonction de la constante de dissociation intrinsèque du groupe. Ce sont des constantes thermodynamiques vraies, définies à partir des activités. Mais on est amené à utiliser pratiquement des constantes apparentes, singularisées par un signe prime et définies à partir de l'activité de H^+ et des concentrations des espèces P qui sont les grandeurs expérimentalement accessibles. Par exemple, en désignant les concentrations par des crochets :

$$k' = \frac{[P^{h-}]}{[P^{(h-1)-}]} (H^+) \quad (I-2 \text{ bis})$$

Toutes les formes d'une même espèce P^{h-} ayant par hypothèse le même coefficient d'activité, les relations établies entre activités et constantes vraies demeurent valables entre concentrations et constantes apparentes. En particulier, les équations (I-6) et (I-10) s'écrivent :

$$[P^{h-}] = [P] (H^+)^{-h} \prod_{j=1}^h k'_j \quad (I-6 \text{ bis})$$

$$k'_h = \frac{m - h + 1}{h} k' \quad (\text{I-10 bis})$$

Définissons la valeur moyenne $\bar{h}$ du nombre de protons dissociés par molécule. C'est la grandeur macroscopique directement mesurable. Elle peut être fractionnaire alors que h est forcément un entier :

$$\bar{h} = \frac{\sum_{h=1}^m h \cdot [P^{h-}]}{\sum_{h=0}^m [P^{h-}]} \quad (\text{I-11})$$

En introduisant la relation (I-6 bis), on obtient la forme la plus générale :

$$\bar{h} = \frac{\sum_{h=1}^m h \cdot (H^+)^{-h} \prod_{j=1}^h k'_j}{1 + \sum_{h=1}^m (H^+)^{-h} \prod_{j=1}^h k'_j} \quad (\text{I-12})$$

En utilisant la relation (I-10 bis), on écrit :

$$\prod_{j=1}^h k'_j = (k')^h C_m^h \quad (\text{I-13})$$

ce qui permet de voir que le dénominateur de l'équation (I-12) est le développement du binôme $[1 + k'/(H^+)]^m$

$$[1 + k'/(H^+)]^m = 1 + \sum_{h=1}^m (H^+)^{-h} \prod_{j=1}^h k'_j \quad (\text{I-14})$$

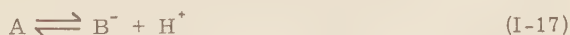
D'autre part il y a une relation algébrique entre le numérateur et le dénominateur de l'équation (I-12) :

$$\sum_1^m h(H^+)^{-h} \prod_1^h k'_j = - (H^+) \cdot \frac{d}{d(H^+)} \left[1 + \sum_1^m (H^+)^{-h} \prod_1^h k'_j \right] = k' m \left[1 + \frac{k'}{(H^+)} \right]^{m-1} (H^+)^{-1} \quad (\text{I-15})$$

A l'aide de (I-12), (I-14) et (I-15), on peut finalement écrire :

$$\bar{h} = m \frac{k'}{(H^+) + k'} \quad (\text{I-16})$$

Soit une solution d'un monoacide A se dissociant selon :



avec la même constante de dissociation apparente k' que la constante intrinsèque apparente relative à l'équation (I-4). Le nombre moyen de protons dissociés par mole ou degré de dissociation α est :

$$\alpha = \frac{k'}{(H^+) + k'} \quad (\text{I-18})$$

Les équations (I-16) et (I-18) montrent que $\bar{h}/m = \alpha$: la dissociation

moyenne par groupe ionisable est identique pour la solution de une mole de polyacide P à m groupes acides et pour la solution de m moles d'un monoacide A de même constante de dissociation intrinsèque. Ce résultat très important permet d'assimiler la première solution à la seconde, ce qui conduit à des calculs très simples. En particulier l'équation de la courbe de titrage est :

$$(H^+) = k' \frac{1 - \alpha}{\alpha} \quad (I-19)$$

et cette relation est indépendante de la masse moléculaire du polyacide. En particulier, elle peut s'appliquer à une solution hétérodispersée.

Il faut souligner que l'hypothèse fondamentale est qu'à chaque degré de dissociation toutes les configurations possibles sont énergétiquement équivalentes. Cela réclame l'absence d'interactions entre les groupes, ou bien un degré de symétrie élevé conduisant à une interaction uniforme entre tous les groupes. Dans les autres cas, comme par exemple distribution hétérogène des charges (polyacides séquencés) ou à degré de symétrie trop faible (polyacides linéaires), la simplification contenue dans l'équation (I-10) est inutilisable et il faut recourir au calcul de l'expression (I-12).

Quand il y a plusieurs classes de groupes, la valeur totale de $\bar{h}$ est la somme des valeurs pour chaque classe.

2/ Modèle moléculaire à symétrie sphérique avec interactions électrostatiques

Dans les cas réels, il faut tenir compte de diverses interactions entre les ions mobiles et les charges fixées sur le polyacide et ceci fait intervenir la configuration du polyélectrolyte en solution qui est en général mal connue. On est donc conduit à admettre un modèle moléculaire raisonnable. En accord avec les remarques précédentes, le modèle adopté par Linderstrøm-Lang [8] et d'autres chercheurs ensuite est le plus simple à traiter parce que le plus symétrique. On admet que la molécule est représentable par une sphère de rayon b sur laquelle sont répartis les groupes ionisables avec une densité superficielle de charges uniformes.

a) Il faut donc étudier la dissociation du monoacide A à la surface de cette sphère conductrice chargée, ensemble désigné comme l'ion P-A.

Plusieurs raisonnements thermodynamiques sont possibles et la littérature manque parfois de précision sur ce point. Il est tout d'abord essentiel de définir clairement l'état de référence choisi. Dans le paragraphe précédent, le polyacide se montre équivalent à un monoacide dans le cas idéal où il n'y a aucune interaction entre les diverses charges. Dans le cas réel, il y a donc intérêt à comparer le polyacide au monoacide. L'état de référence sera la solution de polyacide prise dans des conditions où elle peut être assimilée à la solution du monoacide dans l'état de référence, c'est-à-dire une solution *idéale* de concentration (ou d'activité) des constituants unité et où la charge $Z\varepsilon$ de l'ion P-A est nulle et celle de l'ion P-B⁻ égale à $-\varepsilon$. Dans ces conditions, la variation d'enthalpie libre de la transformation (I-17) pour une mole de P-A est :

$$\Delta G^\circ = -RT \log k \quad (I-20)$$

définissant la constante de dissociation intrinsèque k du groupe acide A.

Soit ΔG la variation d'enthalpie libre de cette transformation *réelle* c'est-à-dire l'ion P-A portant la charge $Z\varepsilon$ et les diverses charges étant soumises aux interactions électrostatiques normales dans un milieu de constante diélectrique D et responsables de la différence $\Delta G - \Delta G^0$. Un premier raisonnement permet de calculer $\Delta G - \Delta G^0$ par la sommation algébrique des variations d'énergie dans la suite d'opérations isothermes suivantes : partant de l'état de référence, on décharge les ions $P-B^-$ et H^+ , on amène tous les constituants à la concentration finale, on charge les ions $P-B^-$ et H^+ en présence de leur atmosphère ionique et enfin, en apportant réversiblement la charge $Z\varepsilon$ sur P-A et $P-B^-$, on arrive à l'état final réel. A ce procédé, on peut préférer un second raisonnement qui a le mérite de traiter le polyacide comme un cas particulier de la théorie de Bjerrum [9] des diacides. Partant de la solution réelle, la variation d'enthalpie libre de la dissociation (I-17) pour le système ramené à des conditions idéales (ions sans influence d'atmosphère ionique et d'activité unité) est :

$$\Delta G - RT \log \frac{\gamma_{P-B^-}}{\gamma_{P-A}} - RT \log \frac{C_{P-B^-}}{C_{P-A}} (H^+) = \Delta G^0 + \Delta G_e^0 \quad (I-21)$$

où γ_{P-A} est le coefficient d'activité de l'ion P-A portant Z charges, γ_{P-B^-} celui de l'ion $P-B^-$ portant $(Z - 1)$ charges et où ΔG_e^0 est l'énergie supplémentaire à fournir au système pour éloigner le proton de l'ion P-A au potentiel ψ_{P-A} .

Pour un ion sphérique P-A portant la charge $Z\varepsilon$, de rayon b et de rayon d'exclusion a , l'équation de Poisson-Boltzmann linéarisée conduit à :

$$RT \log \gamma_{P-A} = - \frac{N Z^2 \varepsilon^2}{2D} \frac{\kappa}{1 + \kappa a} \quad (I-22)$$

d'où :

$$RT \log \frac{\gamma_{P-B^-}}{\gamma_{P-A}} = \frac{(2Z - 1)N\varepsilon^2}{2D} \frac{\kappa}{1 + \kappa a} \quad (I-23)$$

où N est le nombre d'Avogadro et κ le paramètre habituel de Debye-Hückel.

D'autre part, dans ces conditions idéales, $\psi_{P-A} = \frac{Z\varepsilon}{D b}$ d'où :

$$\Delta G_e^0 = - \frac{Z\varepsilon^2}{D b} \quad (I-24)$$

A l'équilibre, $\Delta G = 0$ et en combinant les équations (I-20), (I-21), (I-23) et (I-24), il vient :

$$\begin{aligned} \log k &= \log \frac{C_{P-B^-}}{C_{P-A}} (H^+) - \frac{(2Z - 1)N\varepsilon^2}{2DRT} \frac{\kappa}{1 + \kappa a} + \frac{NZ\varepsilon^2}{DRT b} \\ &= \log \frac{C_{P-B^-}}{C_{P-A}} (H^+) - \frac{N\varepsilon^2}{2DRT} \frac{\kappa}{1 + \kappa a} - 2Z \frac{N\varepsilon^2}{2DRT} \left(\frac{1}{b} - \frac{\kappa}{1 + \kappa a} \right) \end{aligned} \quad (I-25)$$

ou

$$\text{Log } k = \text{Log } K - 2 w Z \quad (\text{I-26})$$

qui s'écrit aussi :

$$k = K e^{-2 w Z} \quad (\text{I-26 bis})$$

dans laquelle on convient que le paramètre w appelé facteur électrostatique est donné par :

$$w = \frac{N \epsilon^2}{2 D R T} \left(\frac{1}{b} - \frac{\kappa}{1 + \kappa a} \right) \quad (\text{I-27})$$

et

$$\text{Log } K = \text{Log} \frac{c_{P-B^-}}{c_{P-A}} (H^+) - \frac{N \epsilon^2}{2 D R T} \frac{\kappa}{1 + \kappa a} \quad (\text{I-28})$$

K est la constante d'équilibre expérimentale vraie c'est-à-dire corrigée du coefficient d'activité de l'ion $P-B^-$ du monoacide auquel le polyélectrolyte est équivalent lorsqu'on néglige la contribution électrostatique des groupes voisins. Cette dernière contribution figure tout entière dans le terme en $2 w Z$. On peut aussi définir une constante de dissociation expérimentale apparente K' non corrigée du coefficient d'activité de $P-B^-$ et valable seulement à la force ionique où sont faites les mesures :

$$\text{Log } K' = \text{Log} \frac{c_{P-B^-}}{c_{P-A}} (H^+) \quad (\text{I-28 bis})$$

Pour une solution de m moles d'acides $P-A$, $\frac{h}{m} = \alpha$ et par suite :

$$K' = \frac{\alpha}{1 - \alpha} (H^+) = \frac{h}{m - h} (H^+) \quad (\text{I-29})$$

La substitution dans l'équation (I-26 bis) également valable entre constantes apparentes fournit l'équation fondamentale du titrage de m moles d'un monoacide chargé auquel on peut appliquer le modèle moléculaire de Linderstrøm-Lang.

$$k' = \frac{h}{m - h} (H^+) e^{-2 w Z} \quad (\text{I-30})$$

qui peut s'écrire de façon plus commode si on accepte l'approximation $pH = -\log (H^+)$:

$$pH = pK' + \text{Log} \frac{h}{m - h} - 0,868 w Z \quad (\text{I-31})$$

b) Si l'on revient au polyacide, on voit que l'équilibre (I-17) qui vient d'être étudié au site i n'est autre que l'équilibre (I-4). L'équation (I-26 bis) permet alors de donner à l'équation (I-3) la forme suivante dans le cas d'interactions électrostatiques :

$$k = \frac{(P_i^{\bar{h}}) \cdot (H^+)}{(P_i^{(h-1)^-})} : e^{-2wZ} \quad (I-32)$$

avec $Z = -(h - 1)$.

Ceci transforme l'équation (I-10) en :

$$k_h = \frac{m - h + 1}{h} k e^{2wZ} \quad (I-33)$$

valable également entre constantes apparentes k'_h et k' sous la forme :

$$k'_h = \frac{m - h + 1}{h} k' e^{2wZ} \quad (I-33 \text{ bis})$$

C'est la forme des k'_h figurant dans la relation générale (I-12). Seulement en substituant l'équation (I-33 bis) dans la relation (I-12), on ne peut plus effectuer de simplification ultérieure et il faut utiliser l'expression complète. Le calcul est long et fastidieux [10] et si le nombre total de groupes est inconnu, l'équation est inutilisable.

L'équation (I-31) montre que la courbe de titrage $pH = f(h)$ du monoacide PA portant Z charges élémentaires est obtenue par déplacement de $0,868 w Z$ de la courbe de titrage du monoacide A non chargé. Vu l'équivalence formelle dans ce dernier cas entre h pour le monoacide et la valeur moyenne $\bar{h}$ pour le polyacide, il est intéressant de rechercher si, l'équivalence entre monoacide et polyacide, établie dans le cas où les groupes sont indépendants, ne peut être pratiquement conservée en substituant à la charge $Z\varepsilon$ du monoacide la charge moyenne $\bar{Z}\varepsilon$ par mole de polyacide. Le calcul [11] aussi bien que l'expérience [10, 12] montrent effectivement que la courbe de titrage d'un polyacide correspondant au modèle de Linderstrøm-Lang est déplacée sensiblement de la quantité $\Delta pH = 0,868 w \bar{Z}$ par rapport au titrage sans interaction ($w = 0$). Linderstrøm-Lang a montré [2] que la déviation statistique standard relative $[(\bar{h}^2) - (\bar{h})^2] / (\bar{h})^2$ calculée d'après l'équation générale (I-12) tend vers zéro quand le nombre m de groupes devient très grand, ce qui justifie partiellement l'approximation précédente. Pratiquement, Scatchard [13] a prouvé qu'il suffit que le nombre m de groupes soit égal ou supérieur à 4 pour que cette approximation n'introduise pas une erreur supérieure aux erreurs expérimentales.

Donc, avec une bonne précision, la forme très simple de l'équation (I-31) est conservée dans l'expression de la dissociation d'un polyacide :

$$pH = pk' + \log \frac{\bar{h}}{m - \bar{h}} - 0,868 w \bar{Z} \quad (I-34)$$

3/ Discussion

Les deux types de raisonnement ci-dessus sont évidemment équivalents mais on peut faire un calcul thermodynamique tout à fait général [43] dont l'expression (I-26) n'est qu'un cas particulier. Ainsi peut être obtenue l'équation suivante [35] :

$$pH = pk' + \log \frac{\bar{h}}{m - \bar{h}} + \frac{0,4343}{kT} \frac{\partial G_e}{\partial \bar{h}} \quad (I-35)$$

où G_e est l'enthalpie libre molaire du champ électrique au point où a lieu la dissociation. Dans le cas du modèle simple précédent, cette grandeur est :

$$G_e = -\frac{N Z^2 e^2}{2 D} \left(\frac{1}{b} - \frac{\kappa}{1 + \kappa a} \right) \quad (\text{I-36})$$

et comme $d\bar{h} = -d\bar{Z}$, on retrouve bien l'équation (I-34). D'autre part, $G_e = \int_0^{\bar{Z}} \psi_h \epsilon d\bar{Z}$, ψ_h étant le potentiel au point de dissociation du h^{ème} proton et par suite :

$$\frac{\partial G_e}{\partial \bar{h}} = -\frac{\partial G_e}{\partial \bar{Z}} = -\psi_h \epsilon \quad (\text{I-37})$$

Le cas le plus général revient donc au calcul du potentiel au point de dissociation. Le raisonnement plus particulier utilisé a l'intérêt de souligner la nature des divers facteurs énergétiques intervenant dans la dissociation et de les rapprocher de ceux intervenant pour les diacides ordinaires.

Par contre, poser ΔG_e° égal à l'énergie électrique nécessaire pour faire passer la charge de l'ion sphérique de $Z\epsilon$ à $(Z-1)\epsilon$, comme on le voit souvent, revient à compter une deuxième fois le travail normal de charge de l'ion de 0 à $-\epsilon$ qui est évidemment déjà compté dans ΔG° .

Le modèle moléculaire simple présenté peut être considéré en fonction de l'aspect moléculaire des phénomènes. Si l'ion sphérique A est plongé dans une solution aqueuse d'électrolyte simple, son comportement électrochimique dépend de la concentration en sel (ou de la force ionique). Si la force ionique est très faible, le rayon b de la sphère est petit par rapport à l'"épaisseur" $1/\kappa$ de l'atmosphère ionique; il n'y a aucune difficulté à considérer que celle-ci est de symétrie sphérique centrée sur l'ion et par suite la charge uniformément répartie à sa surface. Le terme non idéal important dans la dissociation sera le terme de Bjerrum (I-24). Précisément, si $\kappa = 0$, l'équation (I-25) se réduit bien au terme idéal et au terme de Bjerrum. Par contre, si la force ionique est grande, l'"épaisseur" de l'atmosphère devient petite par rapport à la distance entre les charges fixes sur A, chacune d'elles s'individualise en formant une atmosphère ionique partielle. La contribution relative des Z charges fixes voisines au potentiel en un point de la surface du polyion devient ainsi négligeable et cet effet d'écran de l'atmosphère ionique peut théoriquement devenir infini et annuler le terme d'interaction en $2\omega Z$. Cependant d'après l'équation (I-27), quand κ tend vers l'infini, ω tend vers $\frac{N\epsilon^2}{2DRT} \frac{a-b}{ab}$. Par exemple, pour une sphère de rayon $b = 30 \text{ \AA}$ plongée dans un milieu à 25°C de constante diélectrique 80 et de rayon d'exclusion $32 \text{ \AA}$, les valeurs de ω sont de 0,117 pour $\kappa = 0$ et 0,007 pour $\kappa = \infty$. Le facteur électrostatique devient négligeable mais n'est jamais nul. Outre qu'il est absurde d'attendre un accord quantitatif aux forces ioniques élevées d'une théorie basée sur l'approximation de Debye et Hückel, il est possible que l'interaction entre charges voisines ne s'annule jamais à cause de l'effet inducteur intramoléculaire [14] du moins tant que la distance entre charges n'est pas trop grande [15].

La forme de l'équation (I-26) paraît donc correcte d'après cette discussion et bien que basée sur un modèle à répartition continue de la charge, préserve partiellement le caractère de localisation de celle-ci aux forces ioniques élevées.

Cette théorie est basée sur l'approximation de Debye-Hückel permettant de linéariser l'équation de Poisson-Boltzmann en supposant que $\phi \epsilon / kT$ est petit par rapport à un. Ce point a toujours été abondamment controversé mais, sauf pour des polyions cylindriques [16, 28], une approximation est toujours nécessaire. Elle a parfois été faite de façon analogue à celle de Debye-Hückel [29]. L'approximation de Donnan a aussi été proposée [30] et la théorie améliorée par Lifson [31] est en excellent accord avec la résolution numérique de l'équation de Poisson-Boltzmann au calculateur électronique [32]. Quoiqu'il en soit, un des caractères essentiels des phénomènes, souligné ci-dessus, est l'effet d'écran des petits ions de l'atmosphère ionique sur le potentiel des charges fixes. Il est si important que l'entité équivalente apparente du point de vue force ionique d'une solution de polyélectrolyte et de sel ordinaire paraît être un "segment" portant un petit nombre de charges seulement [33]. C'est pourquoi l'approximation de Debye-Hückel est suffisante dans des milieux de force ionique pas trop faible [34] et que la théorie qui en découle s'applique bien aux protéines qui ont une charge moléculaire élevée mais une densité de charge assez faible (de l'ordre de une charge par $30 \text{ \AA}^2$ environ).

Cependant le modèle moléculaire à distribution de charge *sphérique superficielle uniforme* paraît être lui-même une simplification hardie de la réalité dans la plupart des cas.

Tout d'abord, la forme sphérique ne peut convenir raisonnablement qu'à certaines molécules : quelques protéines globulaires ou peut-être des polyélectrolytes linéaires dans un état très contracté de la pelote statistique. Si on considère le cas extrême d'une molécule de polyacide complètement étirée en une chaîne cylindrique mince et rigide avec répartition uniforme des charges à sa surface [16], la variation du facteur $\partial G_e / \partial h$ de l'équation (I-35) en fonction de $\bar{Z}$ n'est plus linéaire sauf pour un domaine assez restreint ($\alpha < 0,3$) où cette forme représente une approximation possible. De plus, sauf dans le cas où une structure covalente particulière (ponts disulfure) ou un système de liaisons hydrogène, par exemple, stabilisent la molécule, en général celle-ci n'est pas rigide et ses dimensions doivent varier avec le degré de neutralisation. C'est le cas général des polyélectrolytes linéaires envisagé ultérieurement et pour lequel $\partial G_e / \partial h$ n'est plus une fonction linéaire de $\bar{Z}$. Cependant des polyaminoacides linéaires portant des groupes acides latéraux et dont la structure très simple est la même que la structure primaire des protéines satisfont correctement à l'équation (I-34) avec une valeur de w donnée par l'équation théorique (I-27) [17]. Pour certains d'entre eux toutefois [18], la variation expérimentale de w tout le long de la dissociation est attribuée à une rigidité insuffisante. L'application empirique de l'équation (I-34) a même été tentée [19] dans le cas de la myosine, protéine dont la molécule rigide est environ cent fois plus longue que large [20, 21].

La forme de la molécule semble donc moins importante que sa rigidité.

Dans le cas d'un polyacide possédant une seule classe de groupes assez nombreuse et distribuée régulièrement ou au hasard, le nombre C_m^h de configurations correspondant à h protons dissociés et entre lesquelles la configuration réelle fluctue constamment est assez grand pour que la densité de charge puisse être considérée comme uniforme. Il n'en est plus de même avec des polyélectrolytes portant à la fois des charges positives et négatives. Certaines configurations sont énergétiquement favorisées. Il faut considérer une distribution localisée de charges qui est plus réaliste. Il est aussi assez improbable que les interactions entre charges puissent être décrites par l'électrostatique dans un continuum de constante diélectrique D égale à celle

du solvant pur [22]. Kirkwood et Westheimer [15] représentent l'ion par une cavité sphérique de constante diélectrique $D_i = 2$ au sein du solvant, l'eau par exemple. Les charges de l'ion sont localisées à une "profondeur" d dans cette cavité. Ce modèle a été appliqué à la dissociation d'un polyacide tel qu'une protéine [23]. Le paramètre d peut être interprété par la distance d'approche minimum de la charge et du solvant et sa valeur est communément voisine de 1 Å pour les ions organiques [24]. Il en est de même pour les configurations-types de polyions étudiées par Tanford [25]. Ces remarques ainsi que l'accessibilité au titrage de pratiquement tous les groupes des polyacides indiquent que la répartition des groupes est probablement superficielle, sinon la molécule est perméable au solvant et le modèle à répartition uniforme devient utilisable [26]. L'équation (I-34) demeure valable mais le paramètre w n'est plus donné par l'équation (I-27) et dépend beaucoup de la distribution des sites sur la molécule ainsi que le pK apparent pour $\bar{Z} = 0$. Il demeure néanmoins que le très important paramètre d est empirique.

Il ressort de cette discussion que le facteur électrostatique w peut utilement être considéré comme un paramètre expérimental dans l'application de l'équation (I-34) aux titrages des polyacides. Les mêmes phénomènes perturbateurs pouvant aussi bien être attribués à des localisations particulières de groupes ou à des interactions non électrostatiques telles que liaisons hydrogène entre groupes [27], les variations éventuelles de w ne doivent être interprétées qu'avec précaution en fonction d'hypothèses sur les phénomènes moléculaires et en ayant une connaissance suffisante des théories générales des polyélectrolytes.

B - THEORIES GENERALES DES POLYELECTROLYTES

De nombreuses théories des polyélectrolytes linéaires plus ou moins complètes ont été élaborées. Il n'est pas nécessaire de les reprendre en détail mais il peut être utile de délimiter les hypothèses et approximations faites avant de considérer les résultats auxquels elles conduisent.

Les hypothèses portent sur le modèle moléculaire utilisé et les approximations principales dans la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann reliant le potentiel à la distribution spatiale des charges.

1/ Un premier groupe de théories utilise des modèles à charge répartie en surface ou en volume.

Par exemple Hermans et Overbeek [36] considèrent que le polyélectrolyte forme une pelote plus ou moins sphérique pouvant se dilater ou se contracter et dans laquelle la charge totale molaire est répartie soit uniformément, soit selon une loi de Gauss. L'école de Kuhn et Katchalsky [35, 37 - 39] considère que la charge est uniformément répartie le long de la molécule. Ces théories se basent sur la statistique des molécules en chaîne convenablement corrigée par un facteur de Boltzmann faisant intervenir l'énergie électrostatique. D'autre part les calculs de Hill [40] portent sur des modèles complètement rigides (cylindres ou sphères) à charge uniformément répartie en surface ou en volume.

Enfin alors que toutes ces théories font appel plus ou moins nettement à l'approximation de Debye-Hückel, Lifson et Katchalsky [16], d'une part, et Alfrey, Berg et Morawetz [28], d'autre part, ont pu donner une solution rigoureuse de l'équation de Poisson-Boltzmann dans le cas d'une molécule cylindrique rigide.

Sans entrer dans le détail des théories, il est intéressant de voir quel est le comportement prévu pour le titrage d'un polyélectrolyte par exemple à travers la variation du terme $\partial G_e / \partial Z$ des équations (I-35) et (I-37).

Hermans et Overbeek fournissent des relations conduisant à des calculs longs qui peuvent être écourtés grâce à des abaques que ces auteurs ont calculées. Leurs résultats théoriques sont assez remarquables. Non seulement la valeur de $\partial G_e / \partial Z$ dépend du degré de polymérisation mais, sauf pour le cas d'une concentration en sel ajouté nulle, $\partial G_e / \partial Z$ offre pratiquement un très large palier ou un maximum très étalé qui conduirait à un pK apparent pratiquement constant pendant la majeure partie du titrage.

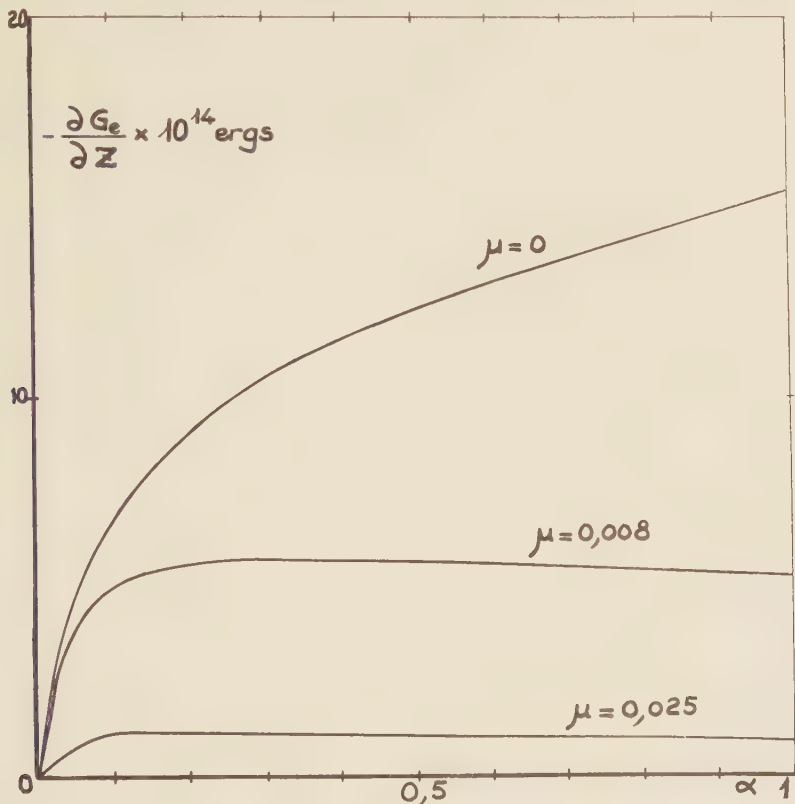


Figure I-1 - Abaque de Hermans et Overbeek pour l'acide polyméthacrylique.

La première théorie de Katchalsky et Gillis [38] ne tenant pas compte des petits ions compensateurs, néglige donc l'effet d'écran qu'ils exercent sur les charges du polyion. Par suite la dilatation prévue par augmentation de la charge est bien trop grande : en fait les calculs montrent par exemple qu'avec les paramètres moléculaires de l'acide polyacrylique l'extension est totale dès un taux de neutralisation $\alpha \simeq 0,1$. Cette théorie est donc trop approximative et il vaut mieux considérer les conséquences de la deuxième théorie de Katchalsky [39].

Dans celle-ci, la concentration en sel simple de la solution est prise assez grande pour que le "rayon de Debye" $1/\kappa$ de l'atmosphère ionique autour de chaque charge soit petit par rapport aux dimensions macromoléculaires. L'effet d'écran est ainsi introduit par l'approximation de D - H

et moyennant certaines hypothèses simplificatrices dans les calculs. La théorie paraît devoir s'appliquer dans le domaine de $10^6 < \kappa < 10^7$ (ou $0,001 < \mu < 0,1$) et pour des taux d'ionisation α pas trop élevés. L'équation (I-38) de Katchalsky et Lifson [39] permet de calculer $\partial G_e / \partial Z$:

$$-\frac{\partial G_e}{\partial Z} = \frac{2\epsilon^2}{D b} \frac{\alpha}{x} \left[\text{Log} \left(1 + \frac{6}{\kappa b} \frac{x}{s} \right) - \frac{s_i - s_o}{2} \frac{\alpha}{s} \frac{\frac{6}{\kappa b} \frac{x}{s}}{1 + \frac{6}{\kappa b} \frac{x}{s}} \right] \quad (\text{I-38})$$

où : b est la longueur du motif monomère du polymère, s détermine la longueur sb de l'unité statistique et est supposé être de la forme $s = (1 - \alpha)s_o + \alpha s_i$, $x = l/Pb$ est le rapport d'extension moléculaire, P étant le degré de polymérisation et l la distance moyenne entre extrémités de la molécule. Pour une concentration saline $c = 0,05 \text{ M}$ ($\kappa = 5,2 \cdot 10^6$) et avec les paramètres $s_o = 9$ et $s_i = 24$, $b = 2,55 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$ adoptés pour l'acide polyméthacrylique [42], on calcule la variation de $\partial G_e / \partial Z$ en fonction de α indiquée sur la figure 2.

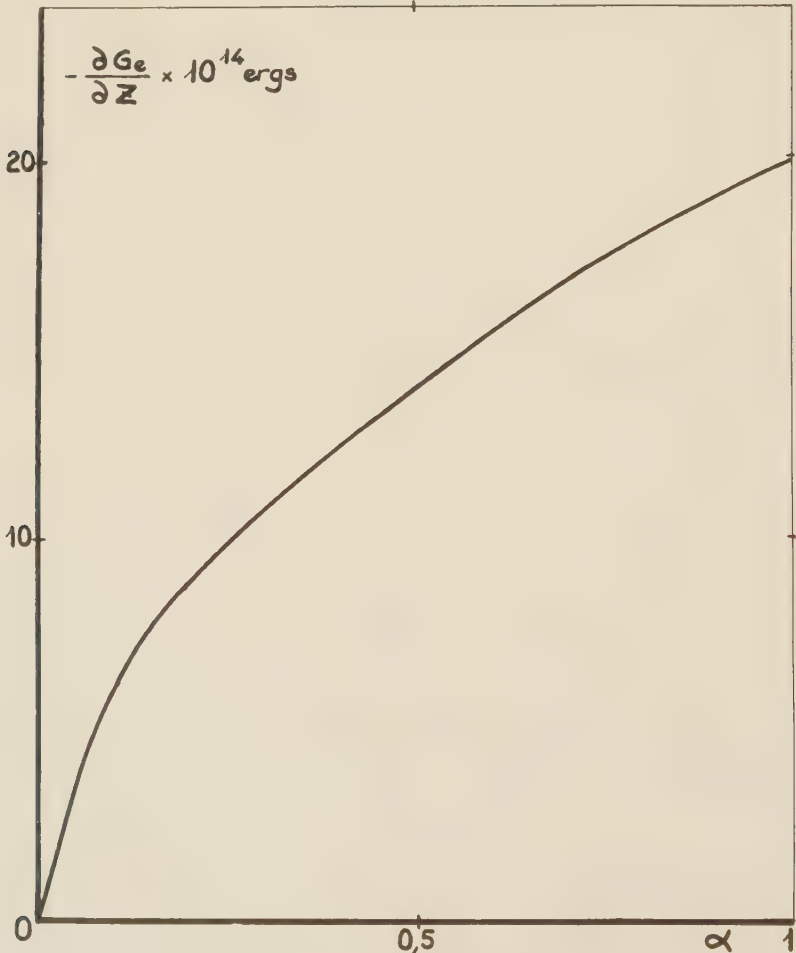


Figure I-2 - Cas d'une pelote statistique avec $\mu = 0,025$.

Cependant lorsque le taux de neutralisation α est assez grand, la densité des charges sur le polyélectrolyte devient telle qu'il est improbable que la molécule de ce dernier puisse être décrite comme une pelote statistique et, surtout si la force ionique est faible, le modèle limite sera une molécule totalement étirée. Les calculs de Hill concernant un certain nombre de modèles à répartition de charge uniforme, dont des modèles cylindriques, aboutissent tous à exprimer l'enthalpie libre électrostatique suivante :

$$G_e = Z^2 f(\kappa, L) \tag{I-39}$$

où f est une fonction de la force ionique et de la géométrie moléculaire. Donc le terme $-\partial G_e / \partial Z$ est directement proportionnel à $-Z$, c'est-à-dire à $+\alpha$.

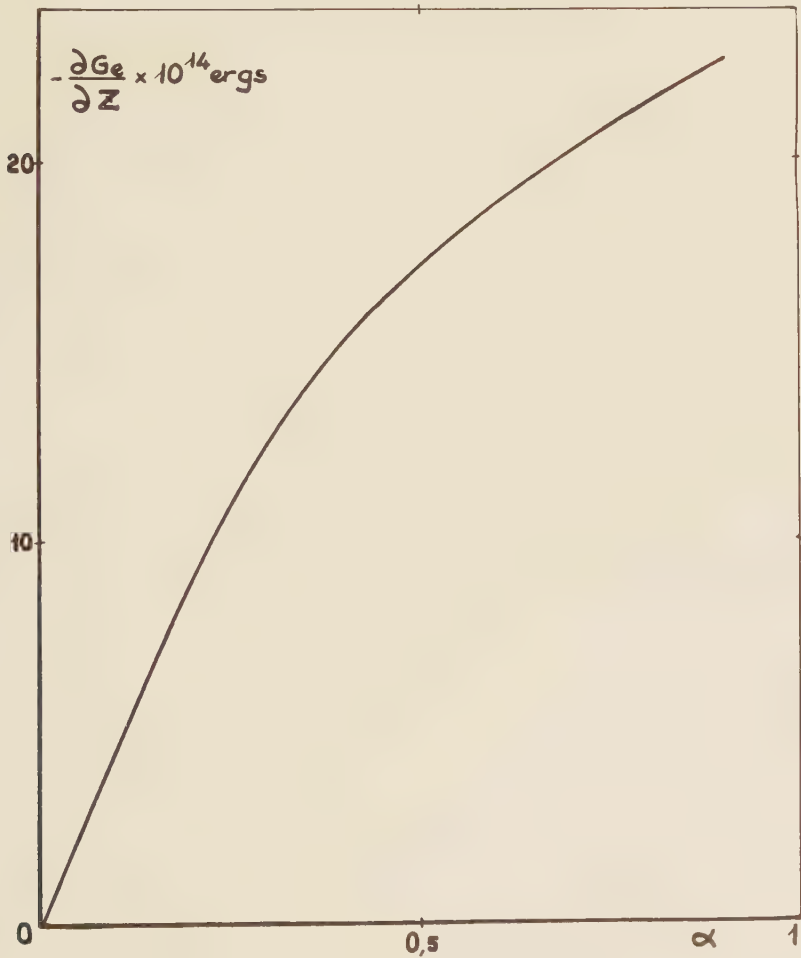


Figure I-3 - Cas d'un cylindre rigide avec $\mu = 0$.

Mais si la densité de charge est si élevée que la molécule soit totalement dépliée, le potentiel local est bien trop grand pour que l'approximation de Debye-Hückel ait un sens surtout si l'effet d'écran de l'atmosphère ionique est négligeable. La solution rigoureuse de l'équation de Poisson-Boltzmann [16] pour un cylindre donne avec les paramètres de l'acide polyméthacrylique et pour une concentration de 0,04 monomole/litre la variation de $\partial G_e / \partial Z$ de la figure 3. Il est évident que, la concentration en sel étranger étant nulle dans cette théorie, la concentration du polyélectrolyte intervient par celle des ions compensateurs.

2/ Toutes les théories précédentes sont seulement en accord qualitatif avec l'expérience et cela n'est pas étonnant si on considère que l'une des hypothèses fondamentales qui leur est commune, c'est-à-dire la répartition uniforme de la charge totale à travers ou sur la molécule, n'a pas de sens physique. Cela revient à dire que, si on considère un groupe ionisable situé en un point d'une molécule sphérique de rayon R, l'ionisation d'un groupe éloigné augmente la densité électrique de $3/4 \pi R^3$ en tout point de la molécule y compris le point considéré.

Plus précisément, la théorie de Kuhn et Katchalsky par exemple est basée sur l'hypothèse que, comme dans la statistique des longues molécules en chaîne non chargée, la probabilité d'une configuration ne dépend que de la distance l entre extrémités. Il est bien plus probable qu'elle dépend de toutes les distances réciproques des charges réelles et que les configurations à charges éloignées sont, à l'égal, plus probables que celles à charges rapprochées. Dans l'énergie du système intervient donc un terme entropique de distribution fonction de la *localisation* précise des charges dans l'espace. D'autre part soit une population nombreuse de groupes chargés et non chargés sur une molécule supposée rigide, il est évident que l'ionisation d'un groupe en un point quelconque aura une influence assez faible sur le potentiel en un site donné, sauf si le point d'ionisation est voisin de ce site. A la localisation de la charge, il faut donc ajouter la conception d'*interaction dominante des groupes voisins* d'un groupe donné. C'est le mérite de Rice [41] d'avoir attiré l'attention sur ces problèmes, mais le traitement théorique qu'il fournit est assez peu satisfaisant. Au lieu d'évaluer les diverses contributions énergétiques à l'enthalpie libre du système macromoléculaire en les supposant additives, il est plus correct de calculer globalement les diverses fonctions thermodynamiques [43, 44]. L'emploi de la thermodynamique statistique conduit aux équations des théories de Marcus, de Lifson, et de Katchalsky, Mazur et Spitnik, avec des formulations différentes mais forcément équivalentes [47, 55, 57]. Ces équations explicitent la relation de titrage $\text{pH} = f(\alpha)$ pour des polyacides à groupes équidistants en fonction du potentiel global ψ_m du polyion et des énergies d'interaction électrostatique de groupes voisins non chargés (E_{oo}), chargés (E_{-}) ou d'une paire composée d'un groupe chargé et d'un groupe non chargé (E_{o-}). Par exemple l'équation de Lifson est :

$$\text{pH} = \text{pk}' - \Delta \text{pK} + \log \frac{1 - \alpha}{\gamma_o} \pm 0,4343 \text{ Arg ch} \left(1 + \frac{\delta}{u} \right) - 0,4343 \frac{\epsilon \psi_m}{kT} \quad (\text{I-40})$$

avec

$$\Delta \text{pK} = \log \frac{u_{--}}{u_{oo}} \quad u_{--} = e^{-E_{--}/kT} \quad u = \frac{u_{--} u_{oo}}{u_{o-} u_{-o}}$$

et

$$\delta = \frac{(1 - 2\alpha)^2}{2\alpha(1 - \alpha)}$$

γ_0 est le nombre relatif de groupes non chargés combinés avec H^+ .

Cette équation tient compte formellement de la combinaison éventuelle des petits ions du "solvant" avec les groupes chargés du polyacide par exemple sous la forme d'une loi d'action de masse avec une constante de dissociation K_c qui ne préjuge pas de la nature de cette "combinaison". Si en solution concentrée ou dans des solvants de faible constante diélectrique, la formation de paires d'ions est possible, il est probable qu'en général cette "combinaison" ne dépasse pas l'état d'association électrostatique sans caractère covalent [45, 58]. Néanmoins, le cas des solutions concentrées en sel simple peut ainsi être envisagé et c'est précisément dans ces conditions que des interactions de groupes immédiatement voisins seront prépondérantes (donc la théorie applicable) et que le potentiel ψ_m sera plus petit et susceptible de faible variation avec α . Dans le cas simple où l'influence du potentiel ψ_m est éliminée (expérimentalement ou par correction) et où la combinaison des ions est négligeable, la variation de $[pH - \log(\alpha/(1-\alpha) - pK')] = pK' - pK'$ qui dans les théories précédentes était représentée par $-\frac{0,4343}{kT} \frac{\partial G_e}{\partial Z}$ varie en fonction de α comme l'indique la figure 4. Lorsque les interactions entre charges voisines sont assez faibles, ($\Delta pK' \leq 0,5$), la variation est pratiquement linéaire, sinon elle est d'allure sigmoïde ($\Delta pK' = 1,58$ est obtenu à partir des paramètres d'interaction de l'acide succinique), et il est évident que si elle est très grande il y a une analogie complète avec un diacide.

Dans le cas où la "combinaison" des petits ions antagonistes présents dans la pelote moléculaire à la concentration c_i ne peut être négligée, il faut tenir compte du terme $\log \frac{1-\alpha}{\gamma_0}$. Sur la figure 5 la variation de $2,302 kT (pK' - pK')$ en fonction du degré de neutralisation apparent r_n est calculée pour un choix arbitraire de $K_c/c_i = 10$, avec les mêmes paramètres d'interaction correspondant à l'acide succinique que ci-dessus. La courbe conserve l'allure sigmoïde aplatie mais la symétrie par rapport à la demi-neutralisation est perdue et la variation totale du pK' est diminuée ($\Delta pK' = 1,46$).

Discussion

a) Le potentiel moléculaire ψ_m

De toutes les théories ci-dessus c'est celle faisant intervenir la localisation des charges et des interactions qui paraît reposer sur les hypothèses les plus acceptables. Mais si elle fait appel à des énergies d'interaction entre groupes chargés et à un équilibre hypothétique de dissociation des ions antagonistes qui peuvent être connus par ailleurs, elle a le défaut de ne pas expliciter le potentiel ψ_m intervenant dans l'équation (I-40). La localisation des charges dans l'espace permet de concevoir une pénétration du polyion par les petits ions et le solvant et conduit à l'approximation de Donnan : la

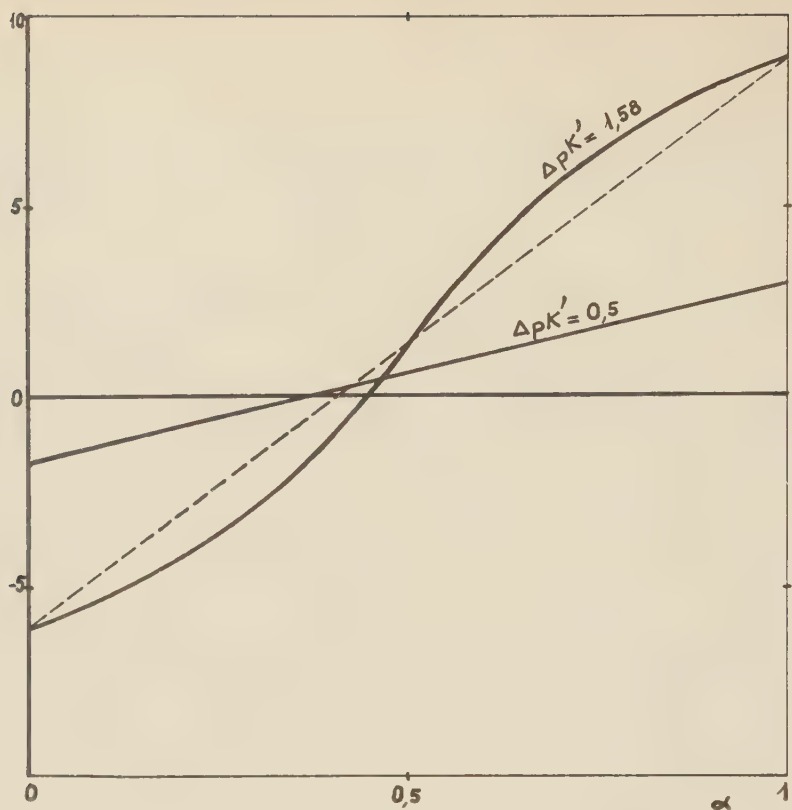


Figure I-4 - Variation de $-2,303 kT (pK' - pk)$ en fonction de α en l'absence de combinaison d'ions antagonistes.

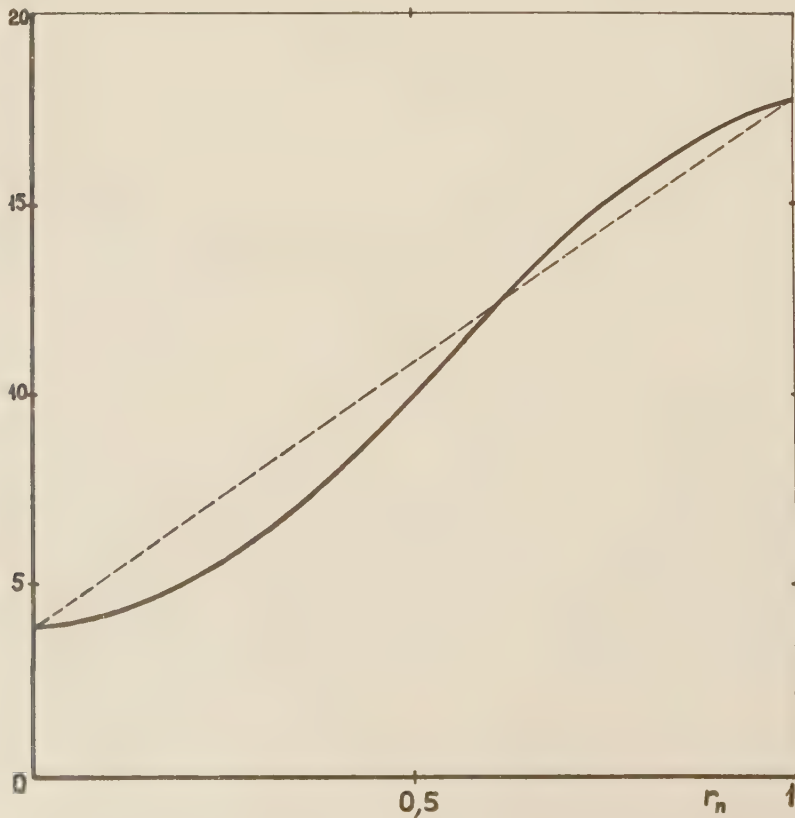


Figure I-5 - Variation de $-2,303 kT (pK' - pk)$ en fonction de α avec combinaison d'ions antagonistes.

densité moyenne des charges est nulle en tout point [30]. La solution approchée obtenue pour ψ_m est assez proche de la solution numérique de Poisson-Boltzmann [32]. Elle peut même être améliorée par adjonction d'un terme correctif [31]. Avec l'hypothèse plausible d'une répartition des charges du polyion à densité ρ_0 , constante dans un espace sphérique de rayon r_0 , la variation de ψ en fonction de la distance r au centre du polyion présente un large palier si le polyion est assez grand ($x_0 = \kappa r_0 / \sqrt{2} > 3$) ainsi que le rapport $2f$ de la densité des charges fixes à la concentration du sel ordinaire ($2f = \rho_0 / c \geq 10$). La valeur de ψ à ce palier peut raisonnablement être prise pour ψ_m .

$$\frac{\epsilon \psi_m}{kT} = \text{Arg sh } f \quad (\text{I-41})$$

Le comportement acido-basique du polyacide exprimé par la variation de $2,302 kT (\text{pK}' - \text{pk}')$ en fonction du taux de neutralisation sera donc décrit par la somme des termes représentés par la figure 4 ou la figure 5 selon le cas et du terme $-kT \text{Arg sh } f$. Mais il y a plusieurs objections importantes à cette façon de procéder. Tout d'abord f n'est pas seulement fonction de la charge totale Z du polyion mais aussi de son volume qui varie avec Z . Si bien que f ne peut être relié à l'état d'ionisation du polyion que par l'intermédiaire d'un modèle moléculaire convenable. Enfin les conditions de validité de l'équation (I-41) concernant le volume et la densité de charge du polyion ne sont en général atteintes que pour un taux d'ionisation assez élevé. L'interprétation des courbes expérimentales de titrage dans le cadre théorique envisagé est donc impossible sauf si le terme ψ_m est éliminé. Il peut l'être soit par correction, le potentiel étant par exemple déduit de mesures de mobilités électrophorétiques [46], soit expérimentalement en admettant qu'à des concentrations salines c_i assez élevées le potentiel ψ_m et sa variation avec α deviennent négligeables [47].

b) Les énergies d'interaction entre groupes

Elles sont en principe calculables par l'électrostatique. Par exemple si on considère un polyacide carboxylique, E_{--} , E_{-o} et E_{oo} sont respectivement l'énergie d'interaction entre deux groupes carboxylates voisins, entre un groupe carboxylate et un groupe carboxyle et entre deux groupes carboxyle. Si la distance r entre les charges est connue, le terme E_{--} pourrait s'exprimer par :

$$E_{--} = \frac{\epsilon^2}{D r} \cdot e^{-\kappa r} \quad (\text{I-42})$$

où $e^{-\kappa r}$ serait le coefficient d'écran de l'atmosphère ionique. Cependant ce type de calculs soulève quelques objections importantes. En premier lieu, la constante diélectrique D à utiliser dans l'équation (I-42) n'est pas en général bien connue [26]. La distance des points occupés par les charges ou par les dipôles est généralement de quelques Å seulement et la saturation diélectrique du solvant autour d'un ion prend alors une importance considérable [48]. La valeur de D à employer n'est pas celle voisine de 5, correspondant à une saturation totale qui conduirait à des valeurs absurdes de ΔpK [41a]. Il faut utiliser une constante effective D_e obtenue en mettant sous la forme de l'équation (I-42) l'énergie calculée par circulation de l'infini à r . Mais l'importance de la saturation diélectrique et sa loi de variation avec la distance sont encore mal établies [49]. D'autre part, à l'échelle envisagée, il est très hasardeux de traiter comme des charges ponctuelles des nuages

électroniques polarisables ou comme des dipôles des ensembles atomiques assez complexes et les divers angles et longueurs nécessaires dans le calcul électrostatique classique sont eux-mêmes très mal connus; par exemple la position exacte du vecteur moment dipolaire dans le groupe carboxyle. Enfin une partie notable de l'espace autour des charges ou dipôles considérés est occupée par le reste de la chaîne moléculaire et une partie correspondante de l'interaction est due à l'induction intramoléculaire. La théorie de Kirkwood et Westheimer [15, 50] qui permettrait de tenir compte de ce phénomène n'est malheureusement pas utilisable pratiquement dans les conditions de force ionique et de symétrie moléculaire des polyélectrolytes.

On est donc naturellement conduit à estimer la valeur de ces termes d'interaction dans un polyacide donné par comparaison avec des molécules plus simples, par exemple de monoacide ou de diacide pour lesquelles les énergies d'interaction peuvent se déduire des données expérimentales. Cette comparaison peut se faire sur la base des observations suivantes. L'équation (I-35) peut s'appliquer au cas d'un monoacide comme la glycine :



et s'écrire sous la forme :

$$\text{pK} - \text{pk} = \frac{0,43}{kT} \frac{\partial G_e}{\partial h} \quad (\text{I-44})$$

où pk est relatif ici à l'acide propionique. Pour l'ionisation de un proton on peut écrire $\Delta G_e = E_{+-} - E_{+o}$, en utilisant le même symbolisme que précédemment, donc :

$$\text{pK} - \text{pk} = \frac{0,43}{kT} (E_{+-} - E_{+o}) \quad (\text{I-45})$$

La théorie classique de Bjerrum [9] néglige en fait le terme E_{+o} d'interaction de la charge avec le carboxyle. Cette approximation peut être valable quand la distance r est assez grande. Mais quand l'acide étudié est un diacide carboxylique, modèle intéressant dans la perspective de l'étude des polyacides, par exemple $\text{COO}^- - \text{R} - \text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- - \text{R} - \text{COO}^- + \text{H}^+$ la théorie de Bjerrum conduit à :

$$\text{pK}_2 - \text{pK}_1 - \log 4 = \frac{0,43}{kT} E_{--} \quad (\text{I-46})$$

alors que la théorie thermodynamique correcte prévoit :

$$\text{pK}_2 - \text{pk} - \log 2 = \frac{0,43}{kT} (E_{--} - E_{-o}) \quad (\text{I-47})$$

$$\text{pK}_1 - \text{pk} + \log 2 = \frac{0,43}{kT} (E_{-o} - E_{oo}) \quad (\text{I-48})$$

d'où :

$$\text{pK}_2 - \text{pK}_1 - \log 4 = \frac{0,43}{kT} (E_{--} - 2E_{-o} + E_{oo}) \quad (\text{I-49})$$

La relation (I-48) est d'ailleurs en accord avec la théorie d'Eucken [51] parue dix ans plus tard, quand on néglige l'interaction entre dipôles E_{oo} . Des valeurs de r peuvent être déduites de la comparaison des données expérimentales figurant dans les équations (I-47) et (I-48) et du terme d'interaction limité à E_{--} et E_{oo} , respectivement, dans les deux cas [14] et calculé sur la base de l'électrostatique simple avec constante diélectrique du solvant pur [49]. Ces valeurs apparaissent comme trop grandes lorsqu'elles sont déduites de l'équation (I-47) et trop faibles à partir de l'équation (I-48), mais ce résultat est normal puisque les expressions complètes (I-47) et (I-48) n'ont pas été utilisées.

Enfin une cause de divergence notable généralement passée sous silence est l'hypothèse de la rigidité de la structure de la molécule alors que par le jeu des rotations autour des directions de valences cette structure est susceptible de varier sous l'action des forces créées par l'apparition de charges nouvelles. Il y a donc, lors de l'ionisation, une possibilité supplémentaire de variation de l'énergie du système dont il est difficile en général de tenir compte par le calcul. Des modèles choisis dans la série des acides cyclaniques peuvent aider à éliminer cette complication en permettant de connaître la position des groupes.

c) Cas des polyacides à structure irrégulière et des polyampholytes

Le cas des polyacides à groupes irrégulièrement répartis le long de la molécule ne paraît pas avoir été traité dans son ensemble. L'interprétation de l'influence de séquences régulières de groupes [52, 53] se fait toujours au moyen de théories déjà connues pour les interactions des voisins immédiats. Quant aux polyampholytes, ils n'ont en général été considérés que comme cas particulier des polyacides simples [54], dans les domaines de pH où les diverses classes de groupes sont suffisamment indépendantes. En d'autres termes, bien que la théorie tenant compte des interactions entre groupes conduise à des formulations difficiles [55], lorsque la charge moléculaire est surtout d'un seul signe, le polyampholyte se comporte comme un polyacide ordinaire [56, 41 c].

C - CONCLUSION

De nombreuses études de dissociation de protéines ont été décrites et interprétées sur les bases de la théorie simplifiée à répartition uniforme des charges (I-34). La différence essentielle entre les protéines et les polyacides synthétiques linéaires paraît résider dans une adaptabilité configurationnelle différente aux forces électrostatiques. Dans certains cas, le modèle moléculaire rigide simplifié peut se justifier. Dans d'autres cas, une protéine peut être aussi déformable qu'une molécule de polyacide synthétique. Par conséquent, ces deux classes de polyélectrolytes peuvent être étudiées à la lumière des mêmes théories. Ceci justifie l'exposé détaillé précédent avant d'aborder l'étude expérimentale d'une protéine particulière en solution, la gélatine. Il sera intéressant alors de comparer cette protéine "fibreuse" à molécules douées d'une certaine flexibilité avec un polyacide à longue chaîne linéaire flexible comme l'acide polyacrylique.

Pendant toutes les théories supposent des solutions monodispersées, ce qui est rarement le cas pratiquement. Bien que demeure posé le problème des classes de groupes peu nombreux dans une molécule, aussi bien la théorie que l'expérience la plus répandue indiquent que les propriétés électrochimiques sont indépendantes du degré de polymérisation, si celui-ci est assez élevé

[47, 55, 33]. Cette remarque extrêmement importante permet d'étudier l'électrochimie des solutions de polyélectrolytes sans avoir à considérer le poids moléculaire des espèces en solution.

Enfin, contrairement au cas des solutions d'électrolytes ordinaires, un milieu à force ionique élevée est plus propice pour l'étude des polyélectrolytes, car certaines approximations deviennent alors légitimes. Ainsi l'importance proportionnelle des interactions entre polyions est diminuée, ce qui évite par exemple d'extrapoler les données expérimentales à concentration nulle de polyélectrolyte [22]. La rigidité apparente du polyion est aussi accrue puisque les répulsions électrostatiques entre éléments de polyion sont fortement atténuées par l'augmentation de la concentration en sel indifférent [44]. Par suite les variations du potentiel de la phase moléculaire ϕ_m dues aux variations de volume du polyion sont minimisées. Plus précisément, en solution de faible force ionique il est nécessaire de considérer deux phases en équilibre dans la solution, l'une contenant le polyion et la majeure partie des petits ions, l'autre ne contenant que très peu de petits ions. En solution de force ionique élevée le problème est simplifié par l'égalisation approximative de la concentration en petits ions dans tout le volume de la solution, ce qui se traduit aussi par l'annulation de la différence de potentiel ϕ_m entre le polyion et la solution. En d'autres termes lorsque le rayon de Debye $1/\kappa$ est assez petit [57] la solution de polyacide peut se comparer à une solution de diacide à la même force ionique. Cependant pour que les mesures électrochimiques aient encore un sens, la concentration en sel ne peut être augmentée indéfiniment. Il semble [27 b, 47] qu'une concentration 0,5 molaire de sel uni-univalent soit suffisante.

Enfin dans ces conditions expérimentales, les coefficients d'activité peuvent être considérés comme constants durant un titrage.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COHEN E.J. et EDSALL J.T. - "Proteins, Aminoacids and Peptides" Reinhold Pub. Co. New York (1943), chap. 20.
- [2] LINDERSTRØM-LANG K. et NIELSEN S.O. - "Electrophoresis" M. Bier, Acad. Press. New York (1959), chap. 2.
- [3] GURD F.R.N. et WILCOX P.E. - Ad. Prot. Chem. (1956), 11, 311.
- [4] STEINHARDT J. et ZAISER E. - Ad. Prot. Chem. (1955), 10, 151.
- [5] EDSALL J.T. et WYMAN J. - "Biophysical Chemistry" Acad. Press. New York (1958), Volume I, chap. 9.
- [6] KLOTZ I.M. - "The Proteins" Neurath H. et Bailey K., Acad. Press. New York Volume I A, chap. 8.
- [7] TANFORD Ch. - "Physical Chemistry of Macromolecules" John Wiley & Sons, Inc., Pub. (1961).
- [8] LINDERSTRØM-LANG K. - Compt. Rend. Lab. Carlsberg (1923-1925), 15 n° 7, 1.
- [9] BJERRUM N. - Z. Phys. Chem. (1923), 106, 219.
- [10] CANNAN R.K., KIBRICK A. et PALMER A.H. - Ann. N.Y. Acad. Sc. (1941), 41, 243.

- [11] CANNAN R.K. - Chem. Revs. (1942), 30, 395.
- [12] CANNAN R.K., PALMER A.H. et KIBRICK A. - J. Biol. Chem. (1942), 142, 803.
- [13] SCATCHARD G. - Ann. N.Y. Acad. Sc. (1949), 49, 660.
- [14] WESTHEIMER F.H. et SHOOKHOFF M.W. - J. Am. Chem. Soc. (1939), 61, 555.
- [15] KIRKWOOD J.G. et WESTHEIMER F.H. - J. Chem. Phys. (1938), 6, 506 et 513.
- [16] LIFSON S. et KATCHALSKY A. - J. Polym. Sc. (1954), 13, 43.
- [17] LIFSON S. et KATCHALSKY A. - J. Am. Chem. Soc. (1953), 75, 5284.
- [18] LIFSON S. ET KATCHALSKY A. - J. Am. Chem. Soc. (1956), 78, 3987.
- [19] NANNINGA L.B. - Arch. Biochem. Biophys. (1955), 56, 349.
- [20] PORTZEHL H. - Z. Naturforsch. (1950), 5 b, 75.
- [21] HOLTZER A. et LOWEY S. - J. Am. Chem. Soc. (1959), 81, 1370.
- [22] TANFORD Ch. et KIRKWOOD J.G. - J. Am. Chem. Soc. (1957), 79, 5333.
- [23] TANFORD Ch. - J. Am. Chem. Soc. (1957), 79, 5348.
- [24] TANFORD Ch. - J. Am. Chem. Soc. (1957), 79, 5340.
- [25] TANFORD Ch. - J. Phys. Chem. (1955), 59, 788.
- [26] ROBINSON R.A. et STOKES R.H. - "Electrolyte Solutions" Butterworths Sc. Pub. London (1959), Chap.I.
- [27 a] LASKOWSKI M. et SCHERAGA H.A. - J. Am. Chem. Soc. (1954), 76, 6305.
- [27 b] LOEB G.I. et SCHERAGA H.A. - J. Phys. Chem. (1956), 60, 1633.
- [28] ALFREY T., BERG P.W. et MORAWETZ H. - J. Polym. Sc. (1951), 7, 543.
- [29] KAGAWA I. et NAGASAWA M. - J. Polym. Sc. (1955), 16, 299.
- [30] KIMBALL G., CUTLER M. et SAMELSON H. - J. Phys. Chem. (1952), 56, 57.
- [31] LIFSON S. - J. Chem. Phys. (1957), 27, 700.
- [32] WALL F.T. et BERKOWITZ J. - J. Chem. Phys. (1957), 26, 114.
- [33] KAGAWA I. et KATSURA K. - J. Polym. Sc. (1952), 9, 405.
- [34] HARRIS F.E. et RICE S.A. - J. Chem. Phys. (1956), 25, 955.
- [35] KATCHALSKY A. - J. Polym. Sc. (1951), 4, 393.
- [36 a] HERMANS J.J. et OVERBEEK J.T.G. - Bull. Soc. Chim. Belg. (1948), 57, 154.
- [36 b] HERMANS J.J. et OVERBEEK J.T.G. - Rec. Trav. Chim. (1948), 67, 761.
- [36 c] OVERBEEK J.T.G. - Bull. Soc. Chim. Belg. (1948), 57, 252.

- [37] KATCHALSKY A., KUENZLE O. et KUHN W. - J. Polym. Sc. (1950), 5, 283.
- [38] KATCHALSKY A. et GILLIS J. - Rec. Trav. Chim. (1949), 68, 879.
- [39] KATCHALSKY A., LIFSON S. et MAZUR J. - J. Polym. Sc. (1953), 11, 409.
- [40] HILL T.L. - Arch. Biochem. Biophys. (1955), 57, 229.
- [41a] HARRIS F.E. et RICE S.A. - J. Phys. Chem. (1954), 58, 725.
- [41b] RICE S.A. et HARRIS F.E. - J. Phys. Chem. (1954), 58, 733.
- [41c] RICE S.A. et HARRIS F.E. - J. Chem. Phys. (1956), 24, 326.
- [41d] HARRIS F.E. et RICE S.A. - J. Phys. Chem. (1957), 61, 1360.
- [42] KATCHALSKY A., SHAVIT N. et EISENBERG H. - J. Polym. Sc. (1954), 13, 69.
- [43] MARCUS R.A. - J. Chem. Phys. (1955), 23, 1057.
- [44] LIFSON S. - J. Polym. Sc. (1957), 23, 431.
- [45] KOTIN L. et NAGASAWA M. - J. Am. Chem. Soc. (1961), 83, 1026.
- [46] KATCHALSKY A. - J. Polym. Sc. (1954), 12, 159.
- [47] KATCHALSKY A., MAZUR J. et SPITNIK P. - J. Polym. Sc. (1957), 23, 513.
- [48] RITSON D.M. et HASTED J.B. - J. Chem. Phys. (1948), 16 n°1, 11.
- [49] SCHELLAMN J.A. - J. Chem. Phys. (1957), 26, 1225.
- [50] WESTHEIMER F.H. et KIRKWOOD J.G. - J. Chem. Phys. (1938), 6, 513.
- [51] EUCKEN A. - Z. angew. Chem. (1932), 45, 203.
- [52] NAGASAWA M. et RICE S. - J. Am. Chem. Soc. (1960), 82, 5070.
- [53] BOURDAIS J. - "Etude des polyélectrolytes en solution" Thèse, Paris (1958).
- [54] KATCHALSKY A. et MILLER I.R. - J. Polym. Sc. (1954), 13, 57.
- [55] LIFSON S. - J. Chem. Phys. (1957), 26, 727.
- [56] RICE S.A. - Rev. Modern. Phys. (1959), 31, 69.
- [57] MARCUS R.A. - J. Phys. Chem. (1954), 58, 621.
- [58] RICE S.A. et NAGASAWA M. - "Polyelectrolyte Solutions", Academic Press., Londres (1961), chapitre 9.

CHAPITRE II

PROPRIÉTÉS ACIDO-BASIQUES DE LA GÉLATINE

D'après les théories de la dissociation d'un polyacide, commentées dans le chapitre précédent, le titrage par une base d'une classe 1 de groupes acides d'une protéine peut être représenté par une équation du type :

$$\text{pH} = \text{p}k'_1 + \log \frac{\bar{h}_1}{m_1 - \bar{h}_1} - x\bar{Z} \quad (\text{II-1})$$

dans laquelle m_1 représente le nombre de groupes dans cette classe, parmi lesquels, en moyenne $\bar{h}_1$, sont dissociés; $\bar{Z}$ est la charge nette moyenne portée par les molécules, x est une fonction de la géométrie de la macromolécule, de la force ionique du milieu et de la température, spéciale à chaque théorie.

Le nombre total de protons dissociés compte tenu des n classes de groupes est alors :

$$\bar{h} = \sum_{i=1}^n \bar{h}_i \quad (\text{II-2})$$

Moyennant certaines hypothèses comme l'exclusivité de la combinaison des groupes avec le proton, les diverses grandeurs des équations (II-1) et (II-2) peuvent être connues et x sera considéré comme un paramètre expérimental. Selon la théorie simple des protéines globulaires, x prend d'après les équations (I-34) et (II-1) la valeur :

$$x = 0,868 \text{ } \omega = \text{constante} \quad (\text{II-3})$$

Compte tenu du nombre très important de travaux ayant utilisé cette théorie et ce symbolisme [9, 10], l'étude de la gélatine sera abordée avec l'équation (II-3) comme hypothèse de travail.

A - METHODE EXPERIMENTALE

L'essentiel de la méthode expérimentale a déjà été décrit [1, 2]. L'exposé suivant décrit les principaux points intéressants.

1/ Produits et réactifs

La gélatine étudiée appartient à un lot unique de gélatine d'osseiné chaulée fabriquée par la Compagnie Rousselot. Le produit est complètement purifié des électrolytes présents par dialyse et électrodialyse sous un champ

de 100 volts par centimètre environ. Le gel découpé et séché à l'air est broyé à l'état de poudre grossière et conservé en flacons bouchés. Le point isoionique est sensiblement 5,00. L'analyse indique l'absence complète de matières minérales et fournit un taux d'azote de 18,36 % rapporté au produit sec. Les corrections d'humidité sont faites à partir de déterminations macroscopiques de l'eau perdue par l'échantillon à 80° au-dessus de P_2O_5 , et sous une pression de 20 mm de mercure [2].

Les divers réactifs ou produits utilisés n'ont pas été amené à l'état de plus grande pureté possible lorsque la nécessité n'en apparaissait pas. La plus grande attention a été apportée à l'absence de carbonate dans la solution de base utilisée, étant donné la faiblesse de certaines fonctions acides titrées : un procédé commode et satisfaisant consiste à préparer une solution de potasse pure pour analyses et à la baryter progressivement jusqu'à obtenir un léger excès d'ions baryum en solution. Le milieu "solvant" des titrages est une solution de nitrate de potassium pur 0,5 molaire et le stock de solution d'acide sulfurique est préparé par dilution de SO_4H_2 distillé. L'eau bidistillée ordinaire est employée et l'azote commercial ne renfermant pas d'impuretés gênantes est utilisé tel quel. Les produits servant à la préparation des solutions tampons ont été préparés, purifiés et conservés selon les normes précises établies à cet effet dans des travaux classiques [3, 4]. Les solutions tampons elles-mêmes sont avantageusement préparées par petites quantités et renouvelées fréquemment.

2/ Appareillage et technique

Plusieurs cellules de titrage en pyrex sont utilisées, la plus commode étant composée d'un couvercle plat portant des rodages normalisés pour électrodes, burettes et autres appareils nécessaires et d'une cuve tronconique à double paroi. Le contrôle de la température se fait aisément à l'aide d'une circulation d'eau thermostatée. Les fluctuations de température sont inférieures à 0,05°C. L'atmosphère de la cellule est constamment balayée par un lent courant d'azote ayant barboté dans de l'eau. L'efficacité de l'exclusion du gaz carbonique atmosphérique est prouvée par l'essai concluant suivant : l'eau bidistillée voit son pH s'élever à 6,95 environ et se maintenir indéfiniment à cette valeur. La pile électrochimique employée pour mesurer le pH est :

électrode en verre | solution || HgCl saturé | Hg.

Diverses électrodes de verre sont utilisées en évitant celles à résistance interne supérieure à 200 mégohms ou celles présentant une erreur de sodium trop élevée.

Les appareils de mesures sont toujours des millivolt-mètres amplificateurs à courant continu à lampe électromètre. Diverses vérifications permettent pour chacun d'eux le contrôle de la proportionnalité rigoureuse de la réponse au signal d'entrée, de l'indépendance de celle-ci vis-à-vis de la résistance de la charge dans le domaine utile et de l'exactitude du potentiomètre correcteur de température. L'ensemble pile-appareil de mesure est étalonné avant chaque dosage sur quatre tampons au minimum selon les indications du tableau I, qui donne un exemple-type.

Les valeurs standard des pH des solutions étalons sont adoptées compte tenu des travaux de Dole [3] et d'autres auteurs [5, 6, 7, 8]. Les titrages sont limités du côté alcalin par l'erreur de potassium des électrodes employées.

Tableau I

Température	Valeur	Phtalate acide de potassium	HCl 0,1 m	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ + PO_4HNa_2	Borax
25°	standard lue	4,005	1,085	6,85 ⁵	9,180
		4,005	1,085 ⁵	6,85	9,17
35°	standard lue	4,02	1,08	6,84	9,07
		4,02	1,08	6,84	8,98

3/ Etablissement de la courbe de titrage

Les résultats étant essentiellement indépendants de la concentration en gélatine dans l'intervalle de 1 à 5 %, la concentration utilisée est généralement voisine de 5 %. La solution de gélatine est préparée en mettant à gonfler une masse déterminée de gélatine dans un volume donné de NO_3K 0,5 molaire, puis en provoquant la fusion du gel par un court chauffage à 40°C. Cette solution est conservée en glacière. Pour le titrage on prélève un volume (par exemple 25 cm³) que l'on additionne d'une quantité fixe de SO_4H_2 et on titre par la potasse de molarité m'. Cette méthode permet de couvrir en un seul titrage toute l'étendue de la courbe de dissociation de la protéine. Il faut connaître le nombre de protons combinés à 1 g de gélatine, c'est-à-dire la variation de c_{H^+} quand on introduit 1 g de gélatine dans la solution.

Même en admettant la relation simplifiée :

$$\text{pH} = -\log c_{\text{H}^+} \gamma_{\text{H}^+} \quad (\text{II-4})$$

où c_{H^+} représente la concentration des protons et γ_{H^+} leur coefficient d'activité, il faut encore admettre que γ_{H^+} peut être connu avec précision si la valeur de c_{H^+} doit être déduite de la mesure de pH. Mais dans un milieu de force ionique élevée constante, l'équation approximative (II-4) peut être remplacée par la relation plus exacte :

$$\Delta \text{pH} = -\Delta \log c_{\text{H}^+} \quad (\text{II-5})$$

En particulier dans deux solutions de même force ionique et à la même température, la concentration c_{H^+} est la même si le pH est le même. Cette remarque permet de calculer n_{H^+} , nombre de protons combinés à 1 g de gélatine à partir de l'état isoionique, en fonction des volumes de KOH, V_2 et V_1 , nécessaires pour amener au pH donné, respectivement, la solution de gélatine et une solution dépourvue de gélatine. La valeur de n_{H^+} est donnée par l'équation (II-6) à partir des volumes en cm³ V_1 , V_2 et V_0 , qui est le volume d'équivalence de la solution témoin, et de G, masse en grammes de gélatine titrée [2].

$$n_{\text{H}^+} = \left[\left(V_0 - (V_0 - V_1) \frac{V + V_2}{V + V_1} \right) - V_2 \right] \frac{m'}{G} 10^{-3} \quad (\text{II-6})$$

La valeur de V_1 correspondant à chaque pH étudié peut être déterminée graphiquement à partir des résultats du titrage témoin (tableau II). Cependant aux faibles pH, la pente de la courbe $V_1 = f(\text{pH})$ est élevée et la détermi-

nation graphique de V_1 n'est pas très précise(*). C'est la raison d'une certaine dispersion des points sur le graphique de la figure 1. Néanmoins, un maximum de n_{H^+} , égal à 95.10^{-5} protons par gramme ($\pm 1.10^{-5}$), est visible et l'état correspondant de la protéine peut être pris comme origine des dissociations :

$$\bar{h} = n_{H^+} \text{ max.} - n_{H^+} \quad (\text{II-7})$$

Pour un titrage donné, l'imprécision sur n_{H^+} qui atteint 1 ou 2.10^{-5} à pH 2, n'est que de 0,3 à 0,5 pour les pH supérieurs.

Enfin les dosages sont réversibles aux erreurs expérimentales près et le fait de partir d'un pH assez bas ne peut provoquer une hydrolyse à la température employée [11].

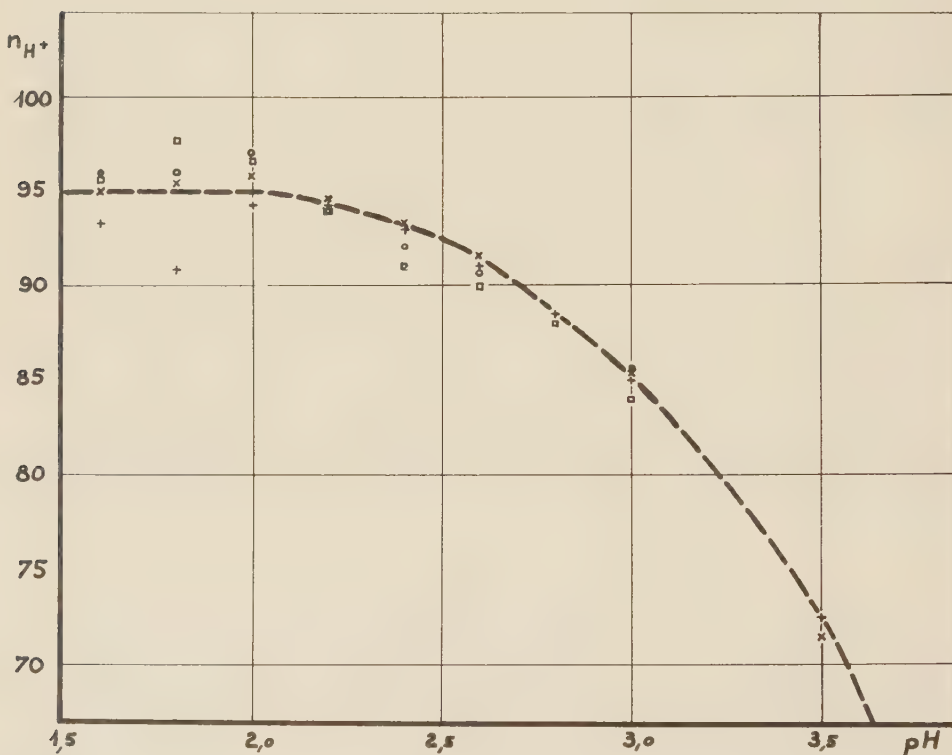


Figure II-1 - Maximum de combinaison du proton avec la gélatine.

(*) Une méthode différente de détermination de V_1 peut être envisagée en utilisant la variation expérimentale linéaire du pH en fonction de $\log c_{H^+}$ lorsque le pH est inférieur à 2,5 environ.

Tableau II

Exemple de calcul de la courbe de dissociation de 2,08 g de gélatine à 25° , dans 60 cm³ de solution (m¹ = 0,890 mole/litre).

pH	V ₂ cm ³	V ₁ cm ³	n _{H⁺} × 10 ⁵	pH	V ₂ cm ³	V ₁ cm ³	n _{H⁺} × 10 ⁵
1,60	0,38	2,46	93,3	5,50	5,71	5,455	-10,9
1,80	1,35	3,40	90,8	6,00	5,82	5,46	-15,4
2,00	2,00	4,16	94,2	6,50	5,89	5,46	-18,4
2,20	2,44	4,61	94,2	7,00	5,93	5,46	-20,1
2,40	2,75	4,90	93	7,50	5,96	5,46	-21,4
3,00	3,32	5,30	85	8,00	5,99	5,46	-22,7
3,50	3,75	5,42	71,5	9,00	6,10	5,47	-27
4,00	4,31	5,44	48,4	10,00	6,50	5,48	-43,6
4,50	4,95	5,44	21	10,80	7,10	5,76	-57,3
5,00	5,45	5,45	0	11,0	7,37	5,96	-61

B - DEPOUILLEMENT RATIONNEL DES COURBES DE DISSOCIATION

1/ Méthode

Les groupements ionisables des protéines sont les groupes "latéraux" des acides aminés constitutifs à l'exception d'un -COOH et d'un -NH₂ terminal par molécule. Ces groupements appartiennent à un petit nombre de types connus et leurs constantes d'ionisation apparente ou leurs zones de dissociation dans l'échelle des pH sont approximativement connues [12, 9, 13, 15] (tableau III).

Tableau III

GROUPE	ORIGINE	pK	ZONE DE DISSOCIATION: PH
α-carboxyle	groupe terminal	3,0- 3,2	} de 2 à 5,5 ou 6
carboxyle	{ ac. aspartique ac. glutamique	3,0- 4,7	
		4,4	
Imidazole	histidine	6,0- 7,0	de 5,5 à 8 environ
α-aminé	groupe terminal	7,6- 8,4	} de 8 à 12
ε-aminé	lysine	9,4-10,6	
phénolique	tyrosine	9,8-10,4	
sulphydrique	cystéine	10	
guanidine	arginine	11,6-12,6	au-dessus de 10

Généralement, l'analyse de la courbe de dissociation se borne à découper celle-ci selon ces zones et à attribuer le nombre de protons correspondant à la dissociation d'un type de groupes. Des valeurs de pK sont choisies de façon à reconstituer par le calcul une courbe passant correctement parmi les points expérimentaux, par exemple, si les équations (II-1) et (II-3) sont employées, en adoptant une valeur du paramètre w déterminée par d'autres méthodes [14]. Certains travaux concernant la gélatine [12, 13] repoussent même toute possibilité d'application des équations (II-1) et (II-3) à cette protéine.

Etant données la relative indécision qui règne dans le domaine théorique et la généralité de l'équation (II-1), une telle exclusive a priori paraît inutile. De toute façon le paramètre w étant considéré comme purement expérimental, une méthode objective d'analyse des courbes de dissociation peut être conçue à partir de l'équation (II-1) et seule l'expérience pourra indiquer si w varie ou bien reste constant.

Lorsque la première classe de groupes (les carboxyles) est assez nombreuse dans une protéine et que la zone de dissociation correspondante n'interfère pas sensiblement avec les zones voisines, une valeur approchée de w peut être obtenue expérimentalement à partir de l'équation de Linderstrøm-Lang [14] :

$$\left(\frac{d \overline{pH}}{d \overline{h}} \right)_{\frac{1}{2}} = 0,868 \left(w + \frac{2}{m_1} \right) \quad (II-8)$$

dont le premier membre est la pente de la courbe de dissociation de la protéine au point milieu du titrage des groupes 1. La méthode des zones de dissociation fournit une valeur de m_1 suffisamment approchée. D'autre part, en ce qui concerne les groupes 1, l'équation (II-1) peut se mettre sous la forme :

$$\log \overline{h}_1 - pH - 0,868 w \overline{Z} = \log (m_1 - \overline{h}_1) - pk'_1 \quad (II-9)$$

ou encore, en désignant le premier membre par $\log Y$:

$$Y = 10^{(\log \overline{h}_1 - pH - 0,868 w \overline{Z})} = k'_1 (m_1 - \overline{h}_1) \quad (II-10)$$

Au début de la dissociation, $\overline{h}_1 = \overline{h}$ et, si les petits ions de la solution ne se combinent pas aux groupes carboxylates (circonstance envisagée dans la discussion), $\overline{Z} = -(\overline{h}_i - \overline{h})$, $\overline{h}_i$ étant le nombre moyen de protons dissociés au point isoionique. Un graphique de la variation généralement non linéaire de Y en fonction de $\overline{h}$ fournit par extrapolation l'abscisse à l'origine m_1 pourvu que le paramètre w ne soit pas trop erroné. Si la détermination de $(d \overline{pH}/d \overline{h})_1$ est assez précise, il suffit de porter la valeur trouvée de m_1 dans l'équation (II-8) pour obtenir la valeur correcte de w qui permet de dresser un graphique $Y = f(\overline{h})$ linéaire où l'ordonnée à l'origine donne la constante intrinsèque apparente d'ionisation k'_1 . Sinon il suffit d'étudier graphiquement la variation en fonction de $\overline{Z}$ du pK , expérimental donné par la relation :

$$pK' = pH - \log \frac{\overline{h}_1}{m_1 - \overline{h}_1} = pk'_1 - 0,868 w \overline{Z} \quad (II-11)$$

La pente de cette droite donne w et l'ordonnée à l'origine pk'_1 .

2/ Application à la dissociation des groupes -COOH à 25°C

Il est commode de rapporter toutes les mesures à 10⁵ g de gélatine. L'application des données du tableau III à la courbe de dissociation de la gélatine fournit la valeur approchée $m_1 = 111$. D'autre part la pente pour $\overline{h} = \frac{1}{2} m_1$ peut être facilement déterminée graphiquement (figure 2) et ne dépend pas de la valeur de m_1 d'une façon critique :

$$\left(\frac{d \text{ pH}}{d h}\right)_{\frac{1}{2}} = 0,018 \quad (\text{II-12})$$

En portant dans l'équation (II-8), il vient :

$$w = 0,00270 \quad (\text{II-13})$$

La courbe a de la figure 3 est construite en portant cette valeur de w et les données expérimentales dans l'équation (II-10). L'extrapolation à $Y = 0$ de cette courbe donne $m_1 = 113$ qui, reportée dans l'équation (II-8) donne une valeur correcte $w = 0,0030$. Cette valeur du paramètre w est satisfaisante puisqu'un nouveau calcul de la fonction Y donne la droite b sur la figure 3. Remarquons que les points expérimentaux relatifs aux très faibles valeurs de h dont la précision est mauvaise ne sont pas portés sur la figure 3.

3/ Dépouillement par itération des autres zones

En possession des paramètres descriptifs de la première classe de groupes m_1 , pk'_1 et w , le nombre moyen h_1 de groupes dissociés de cette

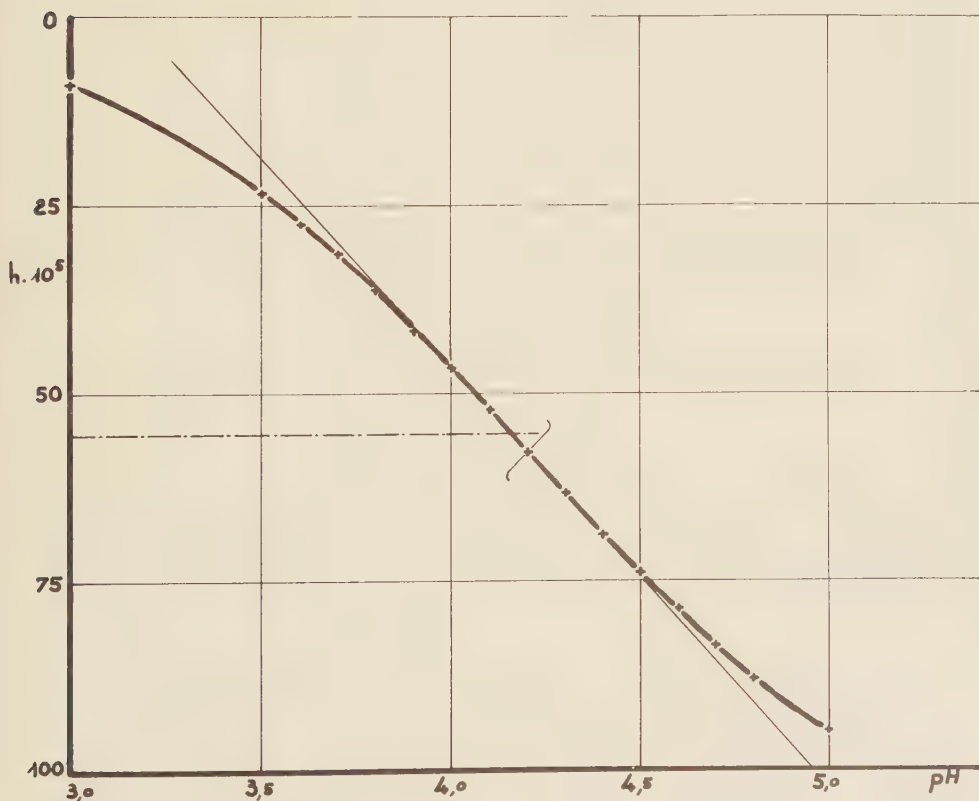


Figure II-2 - Détermination de $\left(\frac{d \text{ pH}}{d h}\right)_{\frac{1}{2}}$

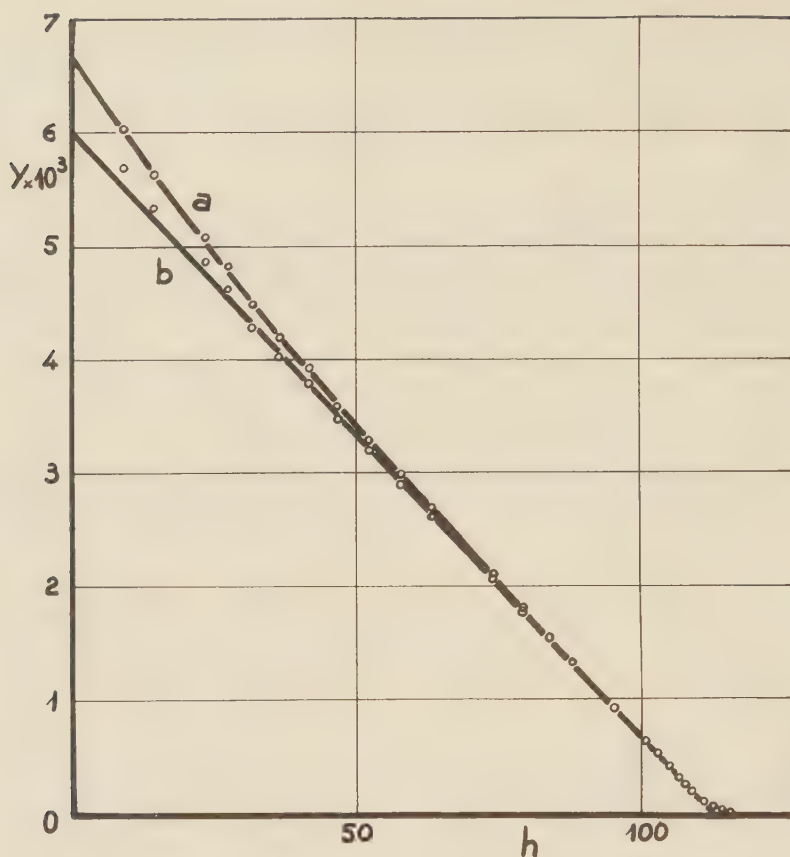


Figure II-3 - Analyse de la première classe de groupes.

classe peut être calculé en fonction du pH. La différence $\bar{h}'$ entre $\bar{h}_1$ et le nombre global expérimental $\bar{h}$ (équation (II-2) représente le nombre de groupes dissociés de la classe 2, puis, à mesure que le pH augmente, de la classe 3 et ainsi de suite :

$$\bar{h}' = \bar{h} - \bar{h}_1 \quad (\text{II-14})$$

Une fonction Y' peut être alors calculée en portant $\bar{h}'$ dans (II-10), le paramètre w restant en principe inchangé. Nous donnons un exemple de calcul dans le tableau IV.

La figure 4 montre la disposition des points expérimentaux bruts dont la dispersion, compte tenu des incertitudes expérimentales, est compatible avec l'existence de la droite tracée d'où se déduit $m_2 = 4,5$.

En répétant le même procédé, on est conduit à la figure 5 et à $m_3 = 39$.

Tableau IV

pH	$\bar{h}$	$-0,0026 \bar{Z}$	$\bar{h}_1$	$\bar{h}'$	$\log \bar{h}'$	$Y \times 10^7$
6,20	111,8	0,044	111,5	0,3	-0,52	2,09
6,40	112,8	0,046	112,0	0,8	-0,097	3,54
6,50	113,4	0,048	112,2	1,2	0,08	4,25
6,60	113,8	0,049	112,4	1,4	0,146	3,93
6,70	114,2	0,050	112,5	1,7	0,231	3,83
6,75	114,3	0,050	112,6	1,7	0,231	3,40
6,80	114,5	0,051	112,6	1,9	0,279	3,39
6,90	114,9	0,052	112,7	2,2	0,349	3,12
7,00	115,1	0,052	112,75	2,35	0,371	2,65
7,10	115,4	0,053	112,8	2,6	0,415	2,33
7,20	115,7	0,054	112,94	2,86	0,457	2,05
7,50	116,4	0,056	112,9	3,5	0,544	1,26
7,60	116,6	0,056	112,94	3,7	0,568	1,06
7,80	117,2	0,058	112,96	4,2	0,624	0,76
8,00	117,7	0,059	112,97	4,7	0,672	0,54

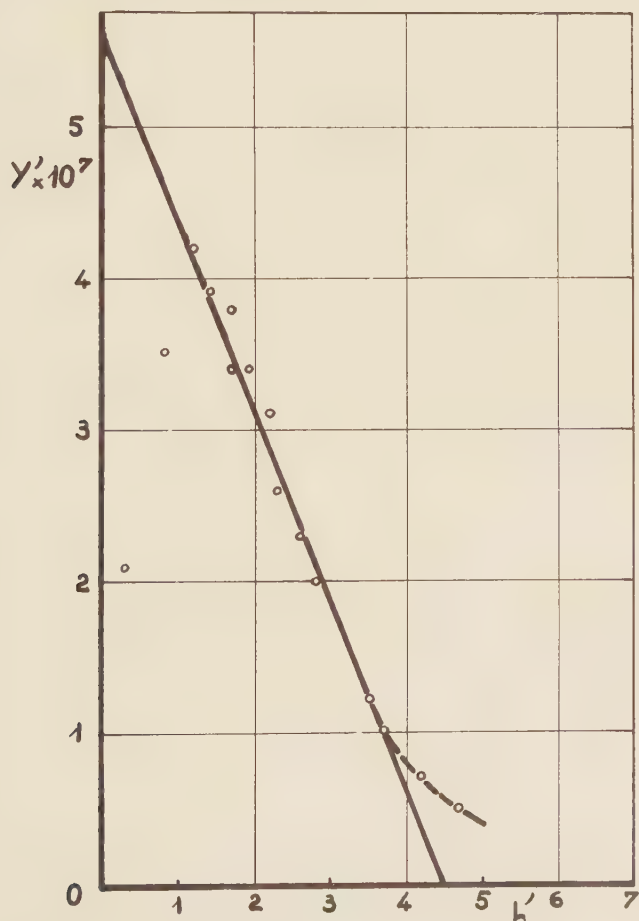


Figure II-4 - Analyse de la deuxième classe de groupes.

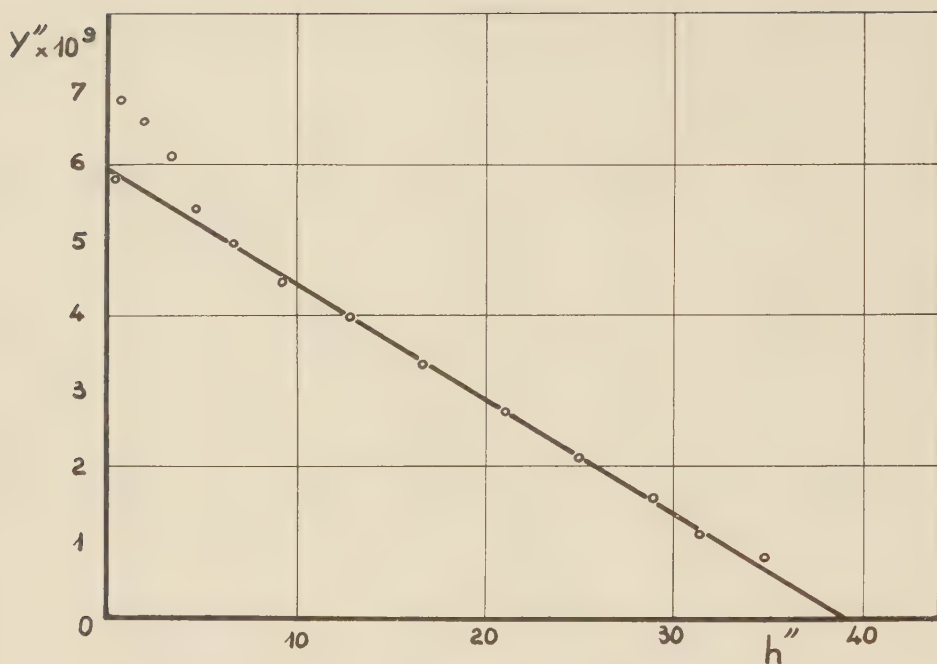


Figure II-5 - Analyse de la troisième classe de groupes.

4/ Tableau des résultats

Les résultats de cette analyse de la courbe de dissociation de la gélatine sont rassemblés dans le tableau V. Ils permettent de reconstruire par le calcul la courbe de dissociation. La comparaison avec les points expérimentaux sur la figure 6 est tout à fait satisfaisante.

Tableau V

Classe de groupes	Nature des groupes	Nombre m de groupes par 10^5 g de gélatine	pK'
1	carboxyle	113	4,28
2	imidazole	4,5	6,90
3	amine	39	9,82

C - DISCUSSION DES RESULTATS

1/ Détermination des enthalpies apparentes d'ionisation

Les résultats précédents peuvent être contrôlés expérimentalement du moins en ce qui concerne l'attribution des classes de groupes. La déter-

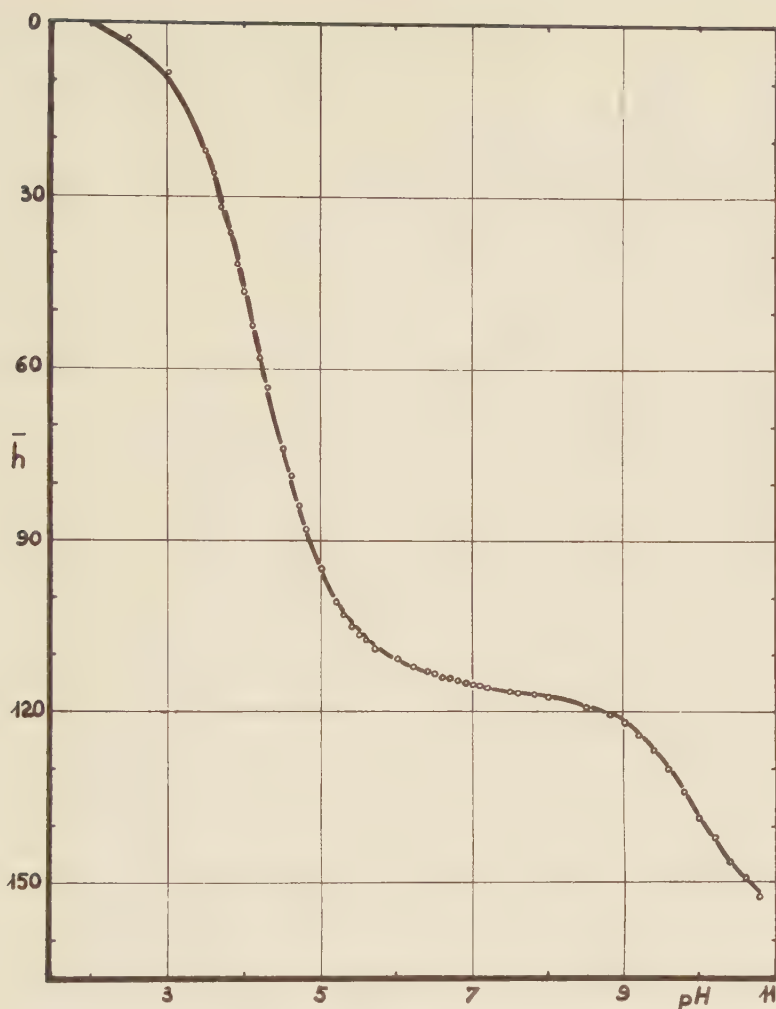


Figure II-6 - Comparaison de la courbe de dissociation calculée avec les points expérimentaux.

mination de l'enthalpie apparente de dissociation se fait aisément à partir du déplacement de la courbe de dissociation sous l'influence de la température à l'aide de l'équation de Wyman [16] qui est l'application de l'équation de Van t' Hoff :

$$\Delta H' = - 2,303 RT^2 \left(\frac{\partial \text{pH}}{\partial T} \right)_h \quad (\text{II-15})$$

Les enthalpies apparentes d'ionisation à la température ordinaire sont comprises entre -1 et +2 kcal/mole pour les groupes carboxyle, voisines de 7 kcal/mole pour les groupes imidazole et varient de 10 à 13 kcal/mole environ pour les groupes amine et guanidine [17]. Les résultats de deux titrages à 25°C et 35°C sont portés sur la figure 7 ainsi que la variation de

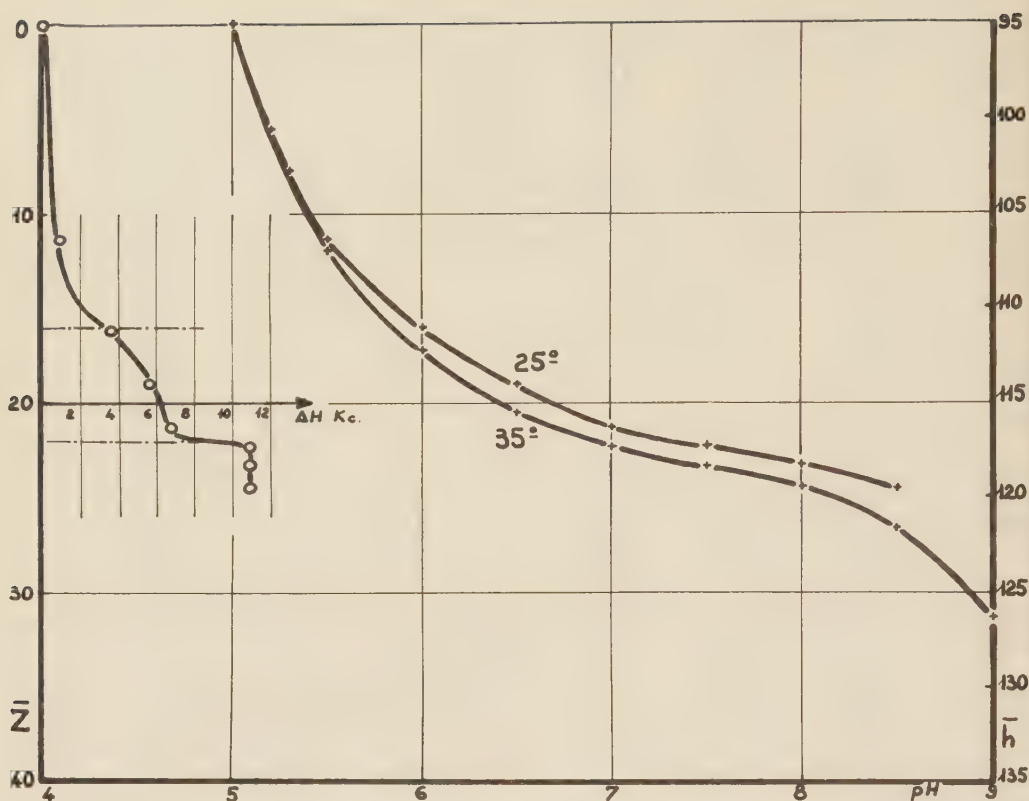


Figure II-7 - Titrages à 25°C et 35°C et détermination de ΔH .

$\Delta H'$ en fonction du pH qui en est déduite. Dans cette zone clef de pH compris entre 5 et 8, l'existence des trois classes de groupes apparaît bien, mais seule la transition entre les classes 2 et 3 est assez nette. Néanmoins la somme $m_1 + m_2 = 117$ ainsi déterminée s'accorde bien avec les valeurs du tableau V ($m_1 + m_2 = 117,5$). De toute façon la numération des groupes imidazole par l'enthalpie apparente d'ionisation ne peut se faire quantitativement si ceux-ci sont en trop petit nombre [18, 19].

2/ Comparaison avec les données analytiques

D'après la valeur maximale de n_{H^+} soit 95 protons pour 10^5 g de gélatine et la valeur de m_1 , il doit exister 208 groupes ionisables auxquels il convient d'ajouter environ 6 groupes phénoliques [20], soit un total de 214 groupes ionisables. Ce résultat global se compare favorablement avec celui sélectionné par Tristram [20] soit 214,2, de même que la valeur maximale de n_{H^+} s'accorde avec l'ensemble des résultats publiés [2].

Les dosages des aminoacides constitutifs de la gélatine par diverses méthodes ne sont pas toujours concordants même lorsqu'ils sont effectués sur le même échantillon. Les résultats disséminés dans plusieurs publications

ont été rassemblés dans quelques articles [20, 21, 22]. Les valeurs obtenues sont assez imprécises en ce qui concerne les acides aminés dicarboxyliques dont le total paraît tout de même s'établir entre 124 et 126 et le nombre correspondant de groupes carboxyle "libres" pour la gélatine varie de 104 à 114 selon le degré d'hydrolyse des groupes amide. Le résultat $m_1 = 113$ paraît donc correct et il est confirmé par la valeur du point isoionique. D'après l'étude de la variation du pH_i en fonction du nombre de groupes carboxyle bloqués qui sera exposée au chapitre IV, un pH_i égal à 5,00 dé-
cèle $11,5 \pm 0,5$ COOH bloqués. Si le nombre total de COOH est 125 en moyenne, il resterait $113,5 \pm 0,5$ groupes carboxyle libres.

Pour les groupes imidazole, les teneurs trouvées pour l'histidine se dispersent entre 4,0 et 4,8 avec une valeur moyenne de 4,5. L'accord est remarquable avec la valeur indiquée dans le tableau V.

En ce qui concerne la lysine et l'hydroxylysine qui fournissent les groupes ε -NH₂, Tristram [20] et Gustavson [22] adoptent une teneur de 39 mais indiquent la présence de 5,5 à 8 groupes phénoliques de la tyrosine qui se dissocient normalement dans le même domaine (tableau III). Cependant Eastoe et Leach [21] donnent pour la somme de ces trois aminoacides une teneur moyenne de 38. Il est donc difficile de décider sur ces seules bases si les 39 groupes trouvés dans la classe 3 sont seulement des ε -NH₂, comme ils ont été désignés dans le tableau V. Dans l'affirmative, il resterait $95 - (4,5 + 39) = 51,5$ groupes arginine dans la zone supérieure de pH qui n'a pu être étudiée. Sinon ce nombre serait encore plus élevé : $95 - (4,5 + (39 - 6)) = 57,5$. Les résultats analytiques compris entre 48 et 51 font ainsi penser que les groupes phénoliques n'apparaissent pas dans l'analyse de la courbe de dissociation donnée.

Ni les groupes α -COOH, ni les groupes ε -NH₂ normalement présents, en extrémité de chaîne ne se révèlent dans cette analyse. Il est vrai que leur nombre est très faible [23, 24, 25], quand il n'est pas supposé nul [26].

Enfin l'ensemble des résultats peut être contrôlé de la manière suivante. Les 4,5 groupes imidazole, les 39 groupes ε -NH₂, les 51,5 groupes arginine, les x groupements peptidiques -CO-NH- et les 11 groupes amide représentent la totalité des contributions au taux d'azote expérimental.

$$[(4,5 \times 2) + 39 + (51,5 \times 3) + x + 11] 14 \cdot 10^{-5} = 18,36 \cdot 10^{-2} \quad (\text{II-16})$$

d'où :

$$x = 1098 \text{ résidus par } 10^5 \text{ g de gélatine.}$$

et par suite la masse moyenne du résidu d'acide aminé est :

$$M = 91,1 \text{ g.}$$

Ce résultat s'accorde raisonnablement avec ceux de Tristram [20] qui donne $M = 91,2 \text{ g}$ et de Eastoe [21] $M = 90,9 \text{ g}$. D'autre part, dans l'hypothèse où la troisième classe de groupes comprendrait aussi les groupes phénoliques, l'équation (II-16) donne alors $M = 92,0 \text{ g}$ ce qui paraît un peu trop élevé.

3/ Interactions électrostatiques

L'analyse de la courbe de dissociation fournit des constantes de dissociation normales par comparaison avec les autres protéines (tableaux III

et V) mais différentes des pK' intrinsèques apparents attendus. En effet le pK' calculé à la force ionique 0,5 [29] d'un groupe carboxyle porté par une chaîne aliphatique [27] est $4,81 - 0,21 = 4,60$ au lieu de 4,28 trouvé et celui d'un ion ammonium porté par une chaîne aliphatique [28] est $10,62 + 0,21 = 10,83$ contre 9,82 trouvé pour la troisième classe. Par contre pour l'imidazole les données bibliographiques intéressantes sont rares : si l'imidazole a un pK de 6,95 [27], il n'y a pratiquement pas de données sur les 5-alkyl imidazoles qui seraient les termes intéressants; le 4 (ou 5) méthyl imidazole a un pK voisin de 7,5 [27].

Ce désaccord entre pK' trouvés et pK' intrinsèques est fondamental : il montre que le succès de la théorie électrostatique simplifiée des protéines ne peut être dans ce cas que fortuit. D'autre part, bien que la symétrie électrique des protéines soit en général élevée [30] la molécule de gélatine n'a pas une structure sphérique rigide avec tous les groupements ionogènes à sa surface. En fait, c'est une pelote moléculaire en solution vraie, tout à fait analogue à la pelote statistique des polyélectrolytes artificiels [31 - 35]. Ceci conduit naturellement à envisager le comportement acido-basique de la gélatine dans la perspective des théories générales des polyélectrolytes exposées dans le chapitre I. Généralement elles ne justifient pas la variation linéaire expérimentale de $(pK' - pK')$ en fonction de la charge $\bar{Z}$, même lorsque la zone de dissociation d'une classe de groupes est bien isolée. Seule, la théorie des interactions localisées entre groupes voisins admet cette variation (figures I-4) et prévoit que le pK' pour $\alpha = 0$ est différent du pK' intrinsèque des groupes. Mais cette théorie ne s'applique pratiquement qu'au cas très simple d'un polyacide où les groupes s'ionisant sont tous équivalents; dans ce cas, pour des groupes anioniques par exemple $\bar{Z} = -m\alpha$ et α s'annule bien avec $\bar{Z}$. Dans le cas d'un polyampholyte à n classes de groupes, on a :

$$\bar{Z} = - \sum_{i=1}^n m_i \alpha_i + \sum_1 \frac{1 + \xi_i}{2} m_i \quad (II-17)$$

avec $\xi_i = +1$ pour la classe i de groupes cationiques et -1 pour des groupes anioniques. La charge $\bar{Z}$ ne s'annule plus pour $\alpha_i = 0$ et les pK' du tableau V n'ont rien de commun ni avec $(pK')_{\alpha=0}$, ni avec les pK' intrinsèques. De toute façon, sauf dans le cas d'une structure de symétrie élevée et de zones de dissociation ne se chevauchant pas, $(pK' - pK')_j$ pour un classe j ne peut plus être uniquement fonction de α_j ni de la charge globale $\bar{Z}$ mais doit être de la forme :

$$(pK' - pK')_j = f(\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_j, \dots, \alpha_n) \quad (II-18)$$

L'expérience montre ici que la fonction f de l'équation (II-18) est, pour la gélatine, linéaire par rapport à $\bar{Z}$:

$$f(\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_j, \dots, \alpha_n) = -x\bar{Z} + \text{constante} \quad (II-19)$$

x étant un coefficient constant.

D'où d'après les équations (II-17) et (II-18) :

$$(pK' - pK')_j = x \sum_{i=1}^n m_i \alpha_i + \text{constante} \quad (II-20)$$

Avec un modèle à interactions localisées, la relation (II-20) est vérifiée si chaque groupe d'une classe j donnée a en moyenne le même environnement. En d'autres termes, il faut que le niveau d'énergie de ce groupe ne dépende que de son état d'ionisation et de la classe j à laquelle il appartient. A priori, ceci est impossible avec un polyacide où toutes les classes n'ont pas le même nombre de groupes, ou bien il faut que les diverses classes soient réparties en séquences homogènes selon le schéma suivant (figure 8).



Figure II-8 - Structure supposée de la chaîne polypeptidique de la gélatine.

Les groupes des classes 1 et 3 sont assez nombreux pour être répartis en séquences analogues à des polyacides simples où leur dissociation dépendra de α_1 et α_3 , respectivement. Pour une classe peu nombreuse comme la classe 2, les groupes seront très probablement isolés comme sur la figure 8 et leur dissociation ne dépendra pas de α_2 . Mais, pratiquement, les variations du terme électrostatique correctif de l'équation (II-1) sont alors si faibles qu'il est difficile de dire si la dissociation dépend ou non de α_2 . D'autre part, si les groupes carboxyle aspartique et glutamique sont mêlés au sein des séquences du type 1, il est normal que l'analyse ne révèle qu'une seule classe caractérisée par un pK moyen.

Cette hypothèse, plausible en elle-même, est malaisée à vérifier. La structure moléculaire fine de la gélatine n'est pas connue. Cependant la composition et diverses propriétés physiques du collagène dont elle est directement dérivée s'accordent avec une structure assez régulièrement séquencée [36, 37, 38, 23, 51, 52]. Leur densité réelle le long de la molécule est certainement plus élevée que leur densité stoechiométrique moyenne, avec tendance à former des séquences homogènes de groupes acides et de groupes basiques. Du point de vue analytique, l'isolement de quatre peptides en très faibles proportions (de 0,5 à 1 % des acides aminés concernés) dans un hydrolysate de gélatine [39] vient, en principe, l'infirmier mais il serait imprudent de conclure sur cet argument. D'autres arguments sont d'ordre électrochimique. Ainsi Edsall, se basant sur l'aspect des courbes de titrage de la gélatine désaminée, estime que les groupes carboxyle sont très éloignés des groupes $\varepsilon\text{-NH}_2$ [12] ce qui est favorable au schéma de la figure 8. D'autre part, contrairement à l'affirmation de Kenchington [13], plusieurs travaux apportent incidemment la preuve de l'influence de la force ionique μ sur la dissociation de la gélatine [34, 40] ou du collagène [41, 42]. Seulement pour ce dernier, cette influence diminue fortement quand μ atteint 0,1 à 0,2 et pour la gélatine nous avons vérifié qu'elle est faible au-dessus de 0,2 [43] (figure 9). Comme alors le rayon de Debye $1/\kappa$ est voisin de 10 Å au maximum ($D = 80$), c'est que l'espacement des groupes est du même ordre de grandeur soit de 3 résidus d'acides aminés en moyenne, en prenant 3,6 Å pour longueur d'un résidu [44]. Si l'on remarque qu'une répartition homogène de tous les groupes au long de la molécule les placerait à 5 résidus

de distance, cette estimation de l'espacement réel est bien compatible avec le schéma proposé.

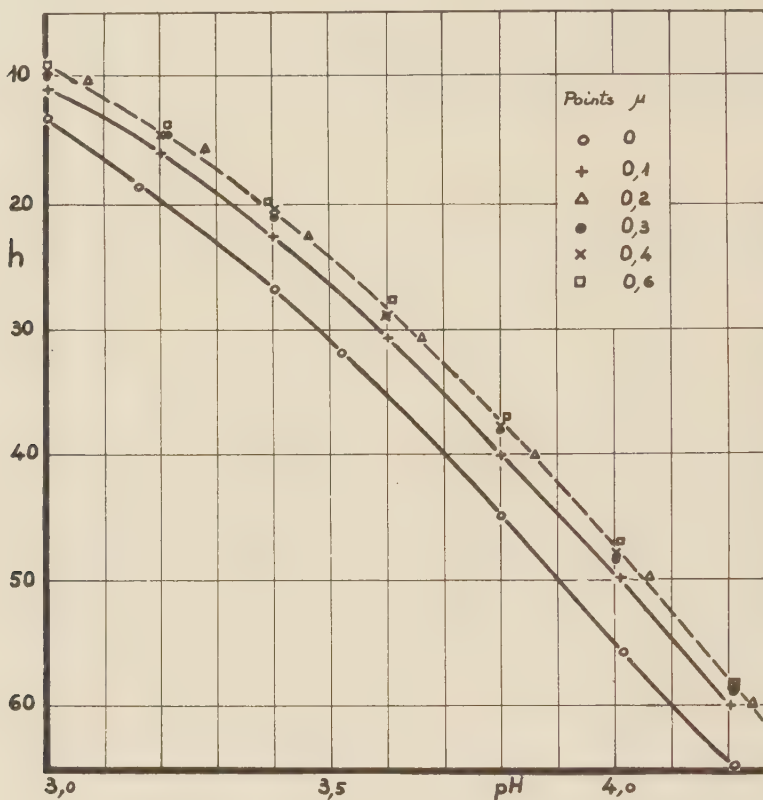


Figure II-9 - Influence de la force ionique sur l'ionisation des COOH.

Avec cette théorie, la différence entre le $(pK')_{a=0}$ trouvé pour une classe de groupes et le pK' intrinsèque de ces groupes à la même force ionique (soit 0,5) doit être attribué aux interactions entre voisins. Par exemple pour les groupes carboxyle, on calcule aisément :

$$(pK_1)_{a=0} = 4,28 - 0,0026 \times 95 = 4,03 \quad (II-21)$$

tandis que le pK' correspondant serait 4,60. L'écart $\Delta pK = 0,6$ peut être considéré comme provoqué par l'action de deux voisins immédiats contribuant chacun pour environ 0,3 unité de pK . Le même écart est observé pour la première ionisation de l'acide succinique, mais cette comparaison est sans objet car l'effet de polarisation est bien plus grand dans la chaîne polypeptidique que dans la chaîne aliphatique. Pour cette raison, la comparaison devrait se faire avec des polypeptides ou des copolymères séquencés d'acides aminés, mais les données de la littérature sont très rares. Les titrages d'acide polyaspartique et de polylysine publiés [45] ne peuvent être utilisés: la force ionique de 0,5 est ici insuffisante à annuler le potentiel moléculaire

ψ . Le groupe $\varepsilon\text{-NH}_2$ central du tripeptide Lysine-Lysine-Lysine a un pK' variant de 9,60 à 9,80 selon la configuration des résidus de Lysine, la force ionique μ étant 0,1 [46]. Pour la gélatine $(pK_3)_{\alpha=0} = 9,88$ pour $\mu = 0,5$.

D - CONCLUSION

Cette analyse du comportement acido-basique de la gélatine en solution souffre d'un risque d'erreur systématique important. Elle repose sur la connaissance de la charge électrique de la protéine évaluée en supposant que la combinaison des petits ions de la solution avec les groupes chargés est nulle. Bien que cette notion ne soit pas toujours admise, elle est assez bien établie par la connaissance actuelle du mécanisme de rétention des petits ions dans le voisinage immédiat des polyions (chapitre I, §B, page 23) et par des mesures directes [40, 47]. D'ailleurs, les courbes de titrage et des expériences séparées nous ont montré que le point isoélectrique de la gélatine dans NO_3K 0,5 molaire est identique au point isoionique.

L'étude exposée dans ce chapitre présente un double intérêt. D'une part, elle montre la possibilité de faire une analyse objective des données expérimentales. Les résultats en confirment bien la validité et permettent de reconstruire correctement la courbe de dissociation moyennant certaines limitations inhérentes à ce genre de calcul : connaissance du pH_i , approximations nécessaires dans le calcul de $\bar{Z}$ quand deux classes de groupes sont simultanément en jeu. D'autre part, par l'introduction des théories générales des polyélectrolytes, la discussion des courbes de dissociation peut utilement être amenée du plan de la géométrie de la molécule considérée ou non comme sphère rigide [48, 49, 50] au point de vue plus particulier de la répartition des groupes.

Il est naturel d'envisager l'application de cette méthode d'analyse au cas d'un polyélectrolyte linéaire de structure simple connue et au cas de gélatines chimiquement modifiées par blocage de certains groupes ionisables. Ce sera l'objet des chapitres suivants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COMBET S. et HAMDIKEN F. - J. Chim. Phys. (1954), 51, 18.
- [2] COMBET S. - J. Chim. Phys. (1956), 53, 422.
- [3] DOLE M. traduit par GIRAUT-ERLER C. - "L'électrode en verre" Dunod, Paris, (1952).
- [4] BATES R.G. - "Electrometrie pH determinations", J. Wiley, New York (1954).
- [5] HITCHCOCK D.I. et TAYLOR A.C. - J. Am. Chem. Soc. (1937), 59, 1812; (1938), 60, 2710.
- [6] MAC INNES D.A., BELCHER D. et SHEDLOVSKY T. - J. Am. Chem. Soc. (1938), 60, 1094.
- [7] British Standards (1950), 1670.
- [8] MANOV G.C. - Am. Soc. Testing Materials, "Symposium on pH measurement" Techn. Publ. (1946), 73, 31.

- [9] STEINHARDT J. et ZAISER E.M. - Adv. Prot. Chem. (1955), 10, 151.
- [10] TANFORD Ch. - "Physical Chemistry of Macromolecules" J. Wiley, Londres (1961), chapitre 8.
- [11] CROOME R.J. - J. App. Chem. (1953), 3, 280.
- [12] COHN E.J. et EDSALL J.T. - "Proteins, Aminoacids and peptides" Reinhold Pub. Co. New York (1943), chapitre 20.
- [13] KENCHINGTON A.W. - "Analytical methods of Protein Chemistry", éditeurs Alexander et Block, Pergamon Press, Londres (1960), chap. 10.
- [14] LINDERSTRØM-LANG K. - Compt. Rend. Lab. Carlsberg (1923-1925), 7, 1.
- [15] KENCHINGTON A.W. et WARD A.G. - Biochem. J. (1954), 58, 202.
- [16] WYMAN J. - J. Biol. Chem. (1939), 127, 1.
- [17] COHN E.J. et EDSALL J.T. - "Proteins, Aminoacids and peptides" Reinhold Pub. Co. New York (1943), chapitre 4.
- [18] ALBERTY R.A. - "The Proteins" éditeurs Neurath et Bailey, Academic Press. New York (1953), volume 1 A, chapitre 6, page 484.
- [19] CANNAN R.K., PALMER A.H. et KIBRICK A.C. - J. Biol. Chem. (1942), 142, 803.
- [20] TRISTRAM G.R. - "The Proteins" éditeurs Neurath et Bailey, Academic Press. New York (1953), volume 1 A, chapitre 3.; Adv. Prot. Chem. (1949), 5, 83.
- [21] EASTOE J.E. et LEACH A.A. - "Recent Advances in Gelatin and Glue Research" éditeur G. Stainsby, Pergamon Press. Londres (1958), p.173.
- [22] GUSTAVSON K.H. - "The Chemistry and reactivity of Collagen" Academic Press. New York (1956), page 37.
- [23] GRASSMAN W. - "The Chemical Structure of Proteins" éditeurs Wolstenholme et Cameron, J.A. Churchill L td. Londres (1953), page 195.
- [24] COURTS A. - Biochem. J. (1954), 58, 70.
- [25] COURTS A. et STAINSBY G. - "Recent Advances in Gelatin and Glue Research" éditeur G. Stainsby, Pergamon Press. Londres (1958), page 100.
- [26] POURADIER J. - "Recent Advances in Gelatin and Glue Research", éditeur G. Stainsby, Pergamon Press. Londres (1958), page 265.
- [27] EDSALL J.T. - "Proteins, Aminoacids and peptides", éditeurs Cohn E.J. et Edsall J.T., Reinhold Pub. Co., New York (1943), chapitre 5.
- [28] ROBINSON R.A. et STOKES R.H. - "Electrolytes solutions", Butterworths Scientific Pub., Londres (1959), page 525, table 2.
- [29] NEUBERGER A. - Proc. Roy. Soc. (1937), A 158, 68.
- [30] SMYTH C.P. - "Dielectric behavior and Structure", Mc Graw-Hill, Londres (1955), chapitre 13.
- [31] POURADIER J. et VENET A.M. - J. Chim. Phys. (1950), 47, 11.
- [32] WARD A.G. - Brit. J. Appl. Phys. (1954), 5, 85.

- [33] WILLIAMS J.W., SAUNDERS W.M. et CICIRELLI J.S. - J. Phys. Chem. (1954), 58, 774.
- [34] BOEDTKER H. et DOTY P. - J. Phys. Chem. (1954), 58, 968.
- [35] GOUNLOCK E.V., FLORY P.J. et SCHERAGA H.A. - J. Polym. Sc. (1955), 16, 383.
- [36] BEAR R.S. - Adv. Prot. Chem. (1952), 7, 69.
- [37] CRICK F.H.C. et KENDREW J.C. - Adv. Prot. Chem. (1957), 12, 133, § III C.
- [38] ANFINSEN C.B. et REDFIELD R.R. - Adv. Prot. Chem. (1956), 11, 1, § IX 3.
- [39] SCHROEDER W.A., KAY L.M., LEGETTE J., HONNEN L. et GREEN F.C.- J. Am. Chem. Soc. (1954), 76, 3556.
- [40] VEIS A., ANESEY J. et COHEN J. - "Recent Advances in Gelatin and Glue Research" éditeur G. Stainsby, Pergamon Press., Londres (1958), 155.
- [41] BOWES J.H. et KENTEN R.H. - Biochem. J. (1948), 43, 358.
- [42] GUSTAVSON K.H. - "The Chemistry and reactivity of Collagen", Academic Press. New York (1956), page 106.
- [43] ROUSSELOT A. - "Contributions à l'étude électrochimique de la Gélatine", Thèse, Paris (1945).
COMBET S. - C.R. Ac. Sc. (1962), 254, 2561.
- [44] COREY R.B. - Adv. Prot. Chem. (1948), 4, 385.
- [45] KATCHALSKY A., SHAVIT N. et EISENBERG H. - J. Polym. Sc. (1954), 13, 69.
- [46] ELLENBOGEN E. - J. Am. Chem. Soc. (1952), 74, 5198.
- [47] CARR C.W. et TOPOL L. - J. Phys. Colloid Chem. (1950), 54, 176.
CARR C.W. - Arch. Biochem. Biophys. (1953), 46, 417.
- [48] KATCHALSKY E. et SELA M. - J. Am. Chem. Soc. (1953), 75, 5284.
SELA M. et KATCHALSKY E. - J. Am. Chem. Soc. (1956), 78, 3986.
- [49] COMBET S. - 86è Cong. Nation. Soc. Sav., Res. Comm. (1961), sous presse.
- [50] TANFORD C., SWANSON S.A. et SHORE W.S. - J. Am. Chem. Soc. (1955), 77, 6414.
- [51] KUBELKA V. - Kozarstvi (1958), 8, 163.
- [52] KÜHN K., HOFMANN V. et GRASSMANN W. - Naturwiss (1959), 46, 512.

CHAPITRE III

LE TITRAGE DE L'ACIDE POLYACRYLIQUE

Dans le chapitre précédent, nous avons utilisé les théories des polyélectrolytes linéaires dans l'analyse des propriétés électrochimiques de la gélatine. Ces dernières s'interprètent au mieux, d'une part en représentant la gélatine par un ensemble de fragments de polyacide carboxylique et de polybases aminées indépendants, et d'autre part au moyen de la théorie des interactions des groupes voisins. Cependant la structure exacte de la molécule n'est pas connue. Il est donc intéressant de faire l'analyse de la courbe de dissociation d'un polyacide linéaire simple d'un point de vue analogue. L'acide polyacrylique est un élément de comparaison assez favorable. Sa structure primaire simple $(-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COOH})-)_n$ ne contient que des groupes carboxyles identiques et équidistants. La littérature ne fournissant en général que l'allure générale des courbes de titrage, nous l'avons établie dans les mêmes conditions employées dans le titrage de la gélatine.

A - RESULTATS EXPERIMENTAUX

1/ Méthode expérimentale

L'acide polyacrylique étudié^(*) est une fraction pure de poids moléculaire supérieur (environ 200 000 [1]) obtenue comme résidu de dissolution fractionnée d'un coacervat préparé par action d'une solution d'acide chlorhydrique sur la solution d'acide polyacrylique commercial^(**) [2]. Le coacervat initial obtenu avec ClH est épuisé méthodiquement par équilibrage avec des solutions chlorhydriques de concentration décroissante. La fraction finale utilisée ne représente que 10 % environ de la masse de polymère non fractionné. L'appareillage et la technique expérimentale sont sensiblement les mêmes que dans le chapitre II. L'acide polyacrylique est titré par la potasse en présence de nitrate de potassium 0,5 m à 25°C, soit directement, soit par différence en partant d'une solution acidifiée par un acide fort comme

(*) L'échantillon a été mis à notre disposition par le Laboratoire de Physique de la Faculté de Pharmacie de Montpellier.

(**) Solution fournie gracieusement par les Etablissements Soprosio, 9 & 10 Quai de Serin, Lyon (IV).

dans le cas de la gélatine. Les deux méthodes donnent les mêmes résultats sauf à pH inférieur à 3,5 environ, où la seconde peut seule donner la courbe de dissociation vraie. Les résultats sont rassemblés dans la figure 1.

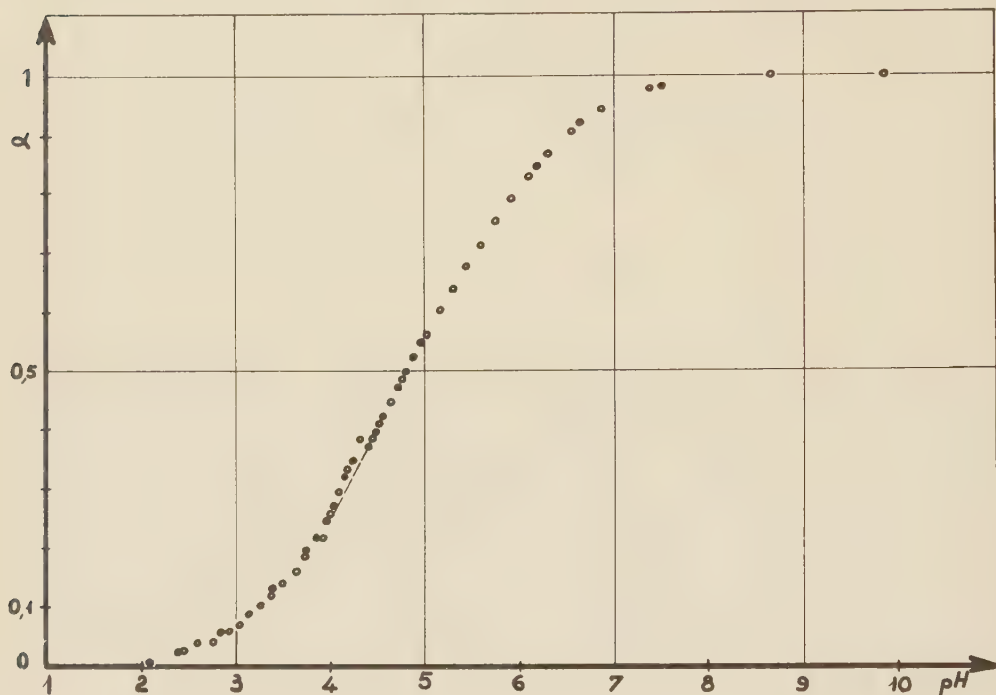


Figure III-1 - Courbe de titrage d'acide polyacrylique fractionné.

2/ Résultats

Le point remarquable du graphique de la figure 1 est l'existence d'une irrégularité importante dans le titrage. Vers $\text{pH} = 4$, commence une partie de courbe appelée "branche anormale" et qui diverge nettement du tracé supposé obtenu par un "lissage" hâtif des données expérimentales. Lorsque le point représentatif du titrage arrive à l'extrémité de ce segment, on peut observer une variation spontanée du pH qui augmente en quelques dizaines de secondes jusqu'à ce que le point représentatif atteigne la courbe principale. Le tableau I donne un exemple partiel de relevé de titrage dans la zone intéressante, la petite échelle de la figure 1 ne permettant pas de bien apprécier le phénomène. On voit qu'atteignant 0,13 unité de pH, la variation spontanée est parfaitement visible. Il faut préciser qu'en dehors de cette zone du titrage les mesures sont parfaitement stables aussi bien sur la "branche anormale" que sur la courbe principale. Le phénomène observé n'est pas accidentel car il a été obtenu dans les divers titrages effectués, avec quelques variations minimes dans la branche anormale, et indépendamment, dans un autre laboratoire [3]. Il est même probable qu'il est apparu dans d'autres travaux sans que l'attention ait jamais été nettement attirée par des irrégularités de la courbe de titrage plus ou moins visibles selon l'espacement et

la précision des points expérimentaux [4, 5]. Il faut cependant noter que les titrages ont rarement porté sur des polyacides fractionnés.

Tableau I

Volume de KOH versé cm ³	pH lu	Observations sur la lecture
1,80	3,90	stable
1,83	4,00	stable
1,86	4,09	stable
1,89	4,18	stable
1,93	4,32	augmente après quelques secondes
	.	
	.	
	4,455	stable après 1 mn environ
1,95	4,53	stable
1,98	4,65	stable

Pour pouvoir discuter des résultats expérimentaux comme il a été fait dans le chapitre précédent, il est nécessaire de les exprimer sous une forme pratique adaptée à la vérification de l'équation (II-1) ou encore de l'équation équivalente :

$$pH = pk' + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} + \varphi \alpha \tag{III-1}$$

avec

$$\varphi = m x \tag{III-1 bis}$$

Dans le cas de l'acide polyacrylique, il n'y a qu'une seule classe de groupes donc la fonction Y de l'équation (II-10) n'est pas adaptée à cette étude et il est préférable de mettre les résultats sous la forme suivante dérivée de l'équation (II-11) :

$$pK' = pH - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} = pk' + \varphi \alpha \tag{III-2}$$

La figure 2 est le résultat de cette représentation. L'allure générale n'est plus, dans ce cas, linéaire et on peut y distinguer pratiquement trois parties. Les parties AB et DE, de faible courbure, encadrent le segment BC qui correspond à la "branche anormale" de la figure 1.

B - DISCUSSION DES RESULTATS

1/ Généralités

La fonction $pK' = f(\alpha)$ représentée par la figure 2 n'est pas une droite et il est inutile d'essayer d'utiliser la théorie des protéines globulaires, ce qui est d'ailleurs évident a priori avec une molécule telle que celle étudiée ici. Les théories des polyélectrolytes basées sur une répartition globale de la charge et des interactions ne prévoient pas non plus explicitement une

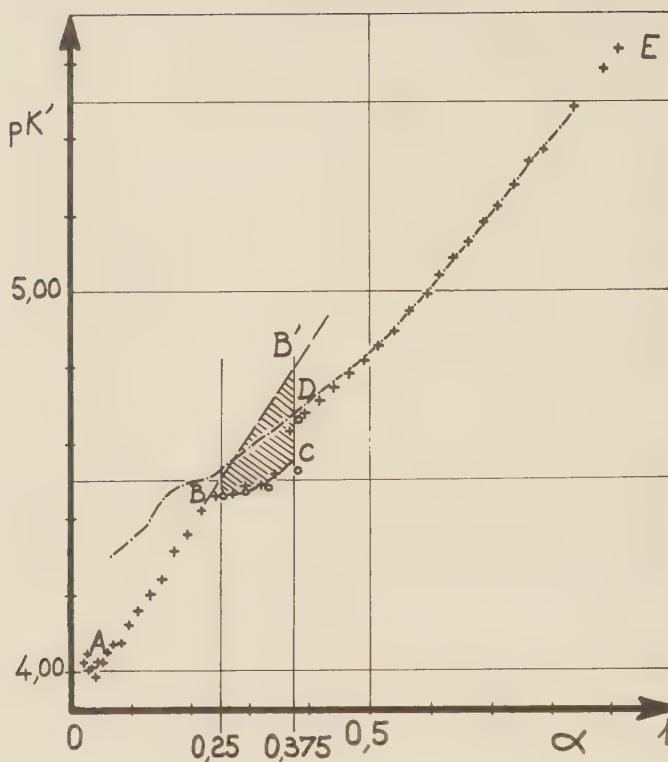


Figure III-2 - Variation de pK' en fonction de α .

telle variation de pK' mais elles font dépendre étroitement pK' de l'extension d'ensemble ou du volume de la molécule. En supposant une variation de ce dernier avec α différente de celle attribuée à la pelote statistique, diverses lois de variations de pK' en fonction de α peuvent être plus ou moins artificiellement justifiées. En particulier, l'existence de la "branche anormale" BC peut être attribuée par exemple à un développement brutal de la molécule lorsque la répulsion électrostatique devient suffisante pour contrebalancer une certaine forme d'association coopérative entre les $-\text{COOH}$. Mais un tel phénomène doit être décelable par l'étude des propriétés hydrodynamiques. Nous avons vérifié que la variation de la viscosité avec le pH est régulière et conforme aux résultats déjà connus. Il n'y a en aucun point du titrage une variation rapide pouvant justifier l'hypothèse précédente. De même le coefficient de diffusion mesuré par méthode interférométrique accuse une variation régulière avec α .

On est donc amené à délaisser ces théories et, comme dans le cas de la gélatine, à envisager l'interprétation des faits sous l'angle des interactions de groupes voisins. La molécule d'acide polyacrylique, bien qu'assez simple, peut présenter une infinité de configurations microscopiques compa-

tibles avec un ensemble donné de valeurs des propriétés hydrodynamiques à cause de la rotation autour des liaisons entre carbones. La théorie des interactions de groupes voisins soulignant l'importance de la disposition relative de ceux-ci, peut permettre de justifier une variation de propriétés thermodynamiques entièrement différente de celle de propriétés macroscopiques, par exemple hydrodynamiques.

2/ Analyse conformationnelle de l'acide polyacrylique

Le polyacide ne peut être étudié correctement en supposant une simple additivité des énergies électrique et configurationnelle, c'est-à-dire en admettant l'indépendance des termes électrique et configurationnel [6]. Lorsque les charges peuvent être très rapprochées comme dans l'acide polyacrylique, il faut tenir compte de l'interdépendance de la configuration locale de la chaîne et des énergies d'interaction électrique. Dans cette étude de configuration, les notations en usage et quelques résultats partiels antérieurs sont utilisés [7, 8, 9]. La nature stéréochimique d'une liaison $\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{COOH})$ est précisée en lui attribuant le signe + si, vu du carbone CH_2 , l'ordre des substituants autour du deuxième carbone est H, COOH, C dans le sens direct; le signe - est donné dans le cas contraire. La configuration précise des atomes autour d'une liaison carbone-carbone est supposée limitée à trois positions par empêchements à la libre rotation : une position trans T des deux substituants carbonés et deux positions cis S et S' symétriques comme l'indique la figure 3 où la liaison C-C étudiée est vue axialement.

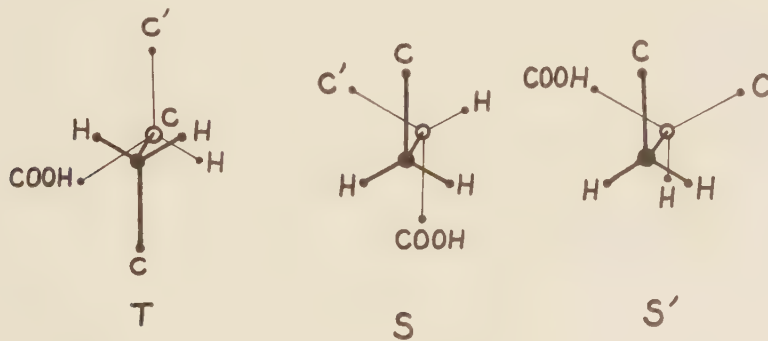
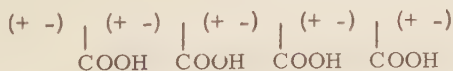


Figure III-3 - Conformations d'une liaison de la chaîne polyacrylique.

Acide isotactique

La molécule peut être représentée par une répétition régulière de paires de liaisons selon le schéma :



Il faut étudier les diverses conformations possibles d'une paire (+ -) et à chacune d'elles correspond une valeur de la distance r des charges quand les groupes COOH sont ionisés. Si ces valeurs r_1 , r_2 , etc. sont classées en série de valeurs croissantes, on obtient le tableau suivant :

Configurations :	TT	TS	TS'	SS	S'S'	SS'	S'S	ST	S'T
Distance des charges :	r_1	r_3	r_2	r_3	r_3	r_1	r_4	r_2	r_3

Après élimination des configurations improbables à cause des interactions stériques (SS' et S'S) et de l'une sur deux des configurations antipodes (TS et S'T, SS et S'S'), les types de possibilités sont :

TT	:	$r_1 = 2,51 \text{ \AA}$
TS'	:	$r_2 = 4,31 \text{ \AA}$
TS et SS	:	$r_3 = 5,23 \text{ \AA}$

Pour achever la description de l'état local de la molécule, il faut connaître l'extension locale imposée à la molécule ou distance entre deux atomes de carbone de la chaîne séparés par les trois carbones constituant la paire de liaison (+ -) étudiée. Ces dimensions ne devant pas être utilisées quantitativement, nous avons seulement effectué des déterminations sur des modèles atomiques. La figure 4 résume les variations relatives de la distance des charges et de l'extension locale pour les divers types de configuration possibles. La chaîne isotactique favorise les configurations TS ou TS'. Donc si l'attraction des COOH n'est pas trop élevée, l'acide polyacrylique non ionisé présentera des configurations TS' et, par suite de la répulsion entre COO⁻, l'ionisation totale conduit à des configurations TS, sans modification de l'ex-

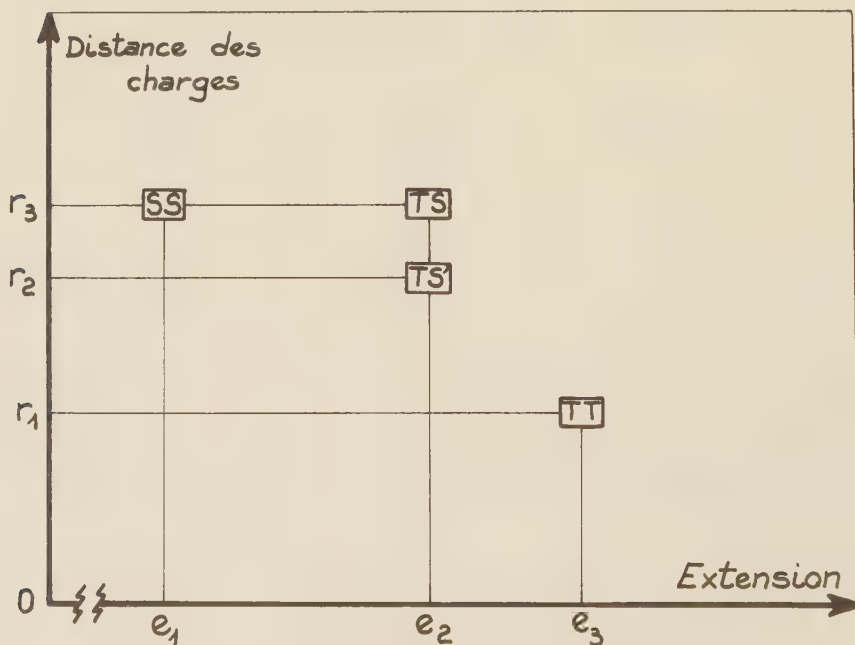


Figure III-4 - Etats possibles d'un segment (+-) de la chaîne isotactique.

tension de la chaîne. Le passage éventuel à des configurations SS avec diminution de l'extension est improbable.

Cependant, cette étude d'une paire de liaisons est insuffisante pour connaître la relation entre énergie d'interaction électrique des charges, et configuration de la chaîne. En effet les groupes ionisables sont rapprochés et les interactions entre voisins n'appartenant pas à la même paire de liaisons peuvent ne pas être négligeables. Il faut considérer maintenant une chaîne constituée d'un grand nombre de telles paires de liaisons. La construction montre que les groupes COOH ou COO⁻ sont disposés sur les arêtes d'un prisme droit à base équilatère selon une succession hélicoïdale de pas AD = 6,5 Å aussi bien pour la "configuration non ionisée" TS'TS'TS' ... que pour la "configuration ionisée" TSTSTS ... (figure 5a). La distance r entre un groupe A et ses voisins successifs B, C, D, ... dans une direction peut être calculée. Si tous ces groupes sont ionisés, l'énergie mutuelle électrostatique du groupe A et d'un voisin quelconque J dans un milieu où le paramètre de Debye-Hückel a la valeur κ est approximativement :

$$E_{A,J} = \frac{\epsilon^2}{D} \frac{e^{-\kappa r_j}}{r_j} \quad (\text{III-3})$$

Les résultats des calculs sont consignés dans le tableau II pour $\mu = 0,5$ ou $\kappa = 2,325 \cdot 10^7$.

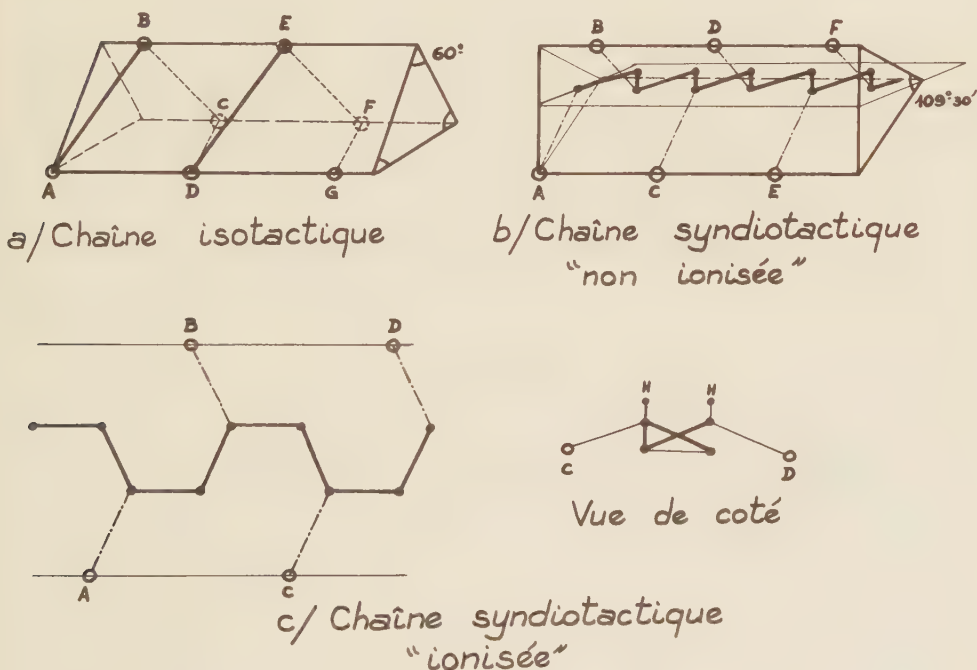


Figure III-5 - Représentation schématique de la disposition relative des groupes.

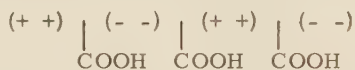
Tableau II

Voisin n°	Configuration T S' T S' T S'		Configuration T S T S T S	
	$r \cdot 10^8$	$\frac{ED}{\epsilon^2} \cdot 10^{-6}$ CGS.	$r' \cdot 10^8$	$\frac{E'D}{\epsilon^2} \cdot 10^{-6}$ CGS
1	4,3	8,51	5,23	5,64
2	5,7	4,63	6,5	3,35
3	6,5	3,35	6,5	3,35
4	9,4	1,18	9,9	1,0
5	11,5	0,59	11,9	0,52

Les influences des voisins successifs sur l'énergie du groupe considéré forment une série assez rapidement convergente. En fait il suffit de tenir compte de trois voisins de chaque côté du groupe pour justifier plus de 90 % de l'énergie électrostatique mutuelle de celui-ci. Dans ces conditions, il est facile de calculer que le passage du polyacide ionisé de la configuration T S' T S' à la configuration T S T S amène une diminution de 30 % de l'énergie électrostatique c'est-à-dire une stabilisation considérable.

Acide syndiotactique

Avec le même symbolisme, la molécule se représente par :



L'étude peut porter sur une paire (+ +) par exemple et les résultats sont transposés facilement pour une paire (- -) en remplaçant une position S par une position S' et vice-versa. Selon un raisonnement analogue au précédent, les types de configurations possibles pour (+ +) sont :

TS	:	$r_1 = 2,51 \text{ \AA}$
TT et SS	:	$r_2 = 4,31 \text{ \AA}$
TS'	:	$r_3 = 5,23 \text{ \AA}$
S'S'	:	$r_4 = 6,01 \text{ \AA}$

Les relations entre ceux-ci et les distances des groupes et l'extension locale sont indiquées schématiquement par la figure 6.

La configuration normale des chaînes syndiotactiques étant TT avec, occasionnellement, une paire SS (ou S'S' s'il s'agit d'une paire (- -)), l'ionisation totale conduit les paires (+ +) et (- -), respectivement, aux configurations TS' et TS, avec modification de l'extension de la chaîne.

Par exemple :

Chaîne	(+ +)	(- -)	(+ +)	(- -)	(+ +)	(- -)	(+ +)	(- -)	(+ +)	(- -)
Etat non ionisé	TT	TT	TT	S'S'	TT	TT	SS	TT	TT	TT
Etat ionisé	TS'	TS	TS'	TS	TS'	TS	TS'	TS	TS'	TS
	contraction			↓	contraction			↓	contraction	
				extension				extension		

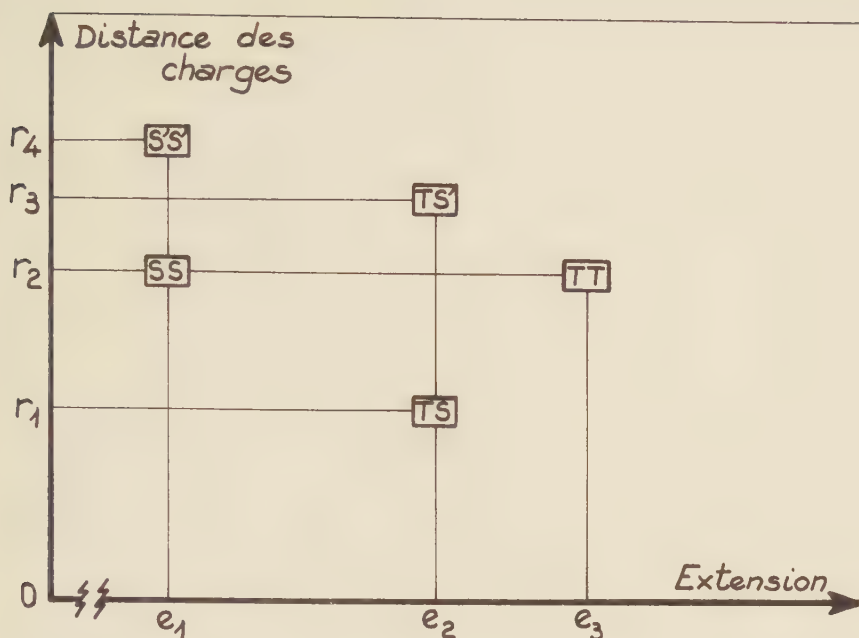


Figure III-6 - Etats possibles d'un segment (++) de chaîne syndiotactique.

En admettant que la chaîne syndiotactique est surtout constituée de longues séquences à configuration TT dans l'état non ionisé, tous les groupes ionisables sont placés dans un même plan avec une disposition particulière, selon qu'il s'agit d'une forme non ionisée (figure 5b) ou ionisée (figure 5c). Le calcul des distances mutuelles et des énergies d'interaction des groupes COO^- d'un acide polyacrylique syndiotactique totalement ionisé fournit les résultats du tableau III à $\mu = 0,5$.

Tableau III

Voisin n°	Configuration T T T T T		Configuration T S T S' T S	
	$r \cdot 10^8$	$\frac{ED}{\epsilon^2} \cdot 10^{-6}$ CGS.	$r' \cdot 10^8$	$\frac{ED}{\epsilon^2} \cdot 10^{-6}$ CGS.
1	4,3	8,51	5,23	5,64
2	5,4	5,26	4,7	7,08
3	8,75	1,49	8,5	1,61
4	10,8	0,74	9,4	1,18
5	13,9	0,28	12,7	0,40

Ici encore la convergence est assez rapide et il suffit de considérer les trois premiers voisins. Le calcul montre alors que le passage d'une

configuration à l'autre ne s'accompagne que d'une diminution de 6 % environ des interactions.

3/ Interprétation des titrages d'acide polyacrylique

L'existence de la "branche anormale" dans les courbes de titrage, non accompagnée d'une variation brutale des dimensions moléculaires, peut être due à une variation rapide des conditions d'interaction des groupes ionisés voisins. En conclusion de l'étude énergétique des diverses configurations de la chaîne polyacrylique à la force ionique $\mu = 0,5$, il existe autour d'un groupe carboxylate six groupes voisins dont l'ionisation produit une augmentation sensible de l'énergie électrostatique qui peut être minimisée par changement de configuration. Le gain d'énergie réalisé par cette transposition est beaucoup plus important pour une chaîne isotactique que pour une chaîne syndiotactique.

Supposons que l'ionisation du polyacide augmente à partir de $\alpha = 0$, l'état le plus probable est, à chaque étape, l'espacement maximum des COO^- . Pour $\alpha = 0,25$, une répartition régulière des COO^- les espace par trois COOH . C'est l'état limite d'ionisation sans augmentation excessive des interactions provoquant une transposition. L'ionisation d'un nouveau groupe a alors sans doute lieu au centre de l'une des séquences de trois COOH pour une chaîne isotactique ou sur le groupe le plus voisin de l'un des COO^- pour une chaîne syndiotactique, d'après la distribution du potentiel. La variation concomitante d'enthalpie libre est minimisée par transposition de ce segment de chaîne de la configuration "non ionisée" à la configuration "ionisée". L'ionisation se poursuit probablement dans une autre séquence / COO^- , COOH , COOH , COOH , COO^- / éloignée au moins d'une séquence de la première. Quand $\alpha = 0,375$, la chaîne se présente comme une suite de séquences de configuration alternativement "non ionisée" et "ionisée". Une dernière transposition peut conduire alors à la forme totalement "ionisée" à α constant et sans variation d'énergie électrostatique.

Sur les figures 1 ou 2, la "branche anormale" débute à $\alpha = 0,25$ et se termine vers $\alpha = 0,35$ à $0,40$ par une variation spontanée du pH ou du pK' . L'interprétation de la courbe expérimentale, par exemple celle de la figure 2, est la suivante. De A en B, il y a ionisation progressive d'un polyacide à configuration "non ionisée" et de D en E, ionisation d'un polyacide à configuration "ionisée", électrochimiquement différent. Pour interpréter les parties BC et CD, il est nécessaire d'approfondir la signification de la grandeur pK' donnée par l'équation (III-2). A partir de celle-ci et de l'équation (I-35), il vient :

$$\text{pK}' = \text{pk}' + \frac{0,4343}{kT} \frac{1}{m} \frac{\partial G_e}{\partial \alpha} \quad (\text{III-4})$$

G_e étant la contribution des interactions électrostatiques entre paires de groupes à l'enthalpie libre du système contenant une mole d'acide polyacrylique, $\frac{1}{m} \frac{\partial G_e}{\partial \alpha}$ est l'enthalpie libre électrostatique partielle par groupe des groupes carboxylates qui est désignée par $\bar{g}_-$.

$$\text{pK}' = \text{pk}' + \frac{0,4343}{kT} \bar{g}_- \quad (\text{III-5})$$

L'aire S de la surface comprise entre le prolongement de AB et BC est proportionnelle à la variation d'enthalpie libre due à la transposition.

$$S = \frac{0,4343}{k T} \left[\int_{\alpha_B}^{\alpha_C} \bar{g}_-^I \cdot d\alpha - \int_{\alpha_B}^{\alpha_C} \bar{g}_- \cdot d\alpha \right] \quad (\text{III-6})$$

équation dans laquelle $\bar{g}_-$ se rapporte à la configuration "non ionisée" et $\bar{g}_-^I$ à la configuration "ionisée".

De $\alpha_B = 0,25$ à $\alpha_C = 0,37$, les groupes qui s'ionisent sont thermodynamiquement identiques, les $\bar{g}_-$ sont constants et l'intégration est immédiate :

$$S = \frac{0,4343}{k T} (\alpha_C - \alpha_B) (\bar{g}_-^I - \bar{g}_-) \quad (\text{III-7})$$

Comme $(\bar{g}_-^I - \bar{g}_-)$ est négatif, la surface S est négative et la branche BC doit bien être située *au-dessous* du prolongement de AB.

La transposition d'une séquence concernant simultanément trois COO^- , le calcul de $\bar{g}_-^I - \bar{g}_-$ en négligeant les interactions avec les dipôles des COOH conduit à :

Chaîne isotactique

Séquence / $\text{COO}^- \text{ COOH } \text{COO}^- \text{ COOH } \text{COO}^- /$

$$S_i = \frac{0,43}{D k T} (\alpha_C - \alpha_B) \left[\frac{4}{3} \left(\frac{e^{-\kappa r_2^I}}{r_2^I} - \frac{e^{-\kappa r_2}}{r_2} \right) + \frac{2}{3} \left(\frac{e^{-\kappa r_4^I}}{r_4^I} - \frac{e^{-\kappa r_4}}{r_4} \right) \right] \quad (\text{III-8})$$

Chaîne syndiotactique

Séquence / $\text{COO}^- \text{ COO}^- \text{ COOH } \text{COOH } \text{COO}^- /$

$$S_s = \frac{0,43}{D k T} (\alpha_C - \alpha_B) \frac{2}{3} \left[\left(\frac{e^{-\kappa r_1^I}}{r_1^I} - \frac{e^{-\kappa r_1}}{r_1} \right) + \left(\frac{e^{-\kappa r_3^I}}{r_3^I} - \frac{e^{-\kappa r_3}}{r_3} \right) + \left(\frac{e^{-\kappa r_4^I}}{r_4^I} - \frac{e^{-\kappa r_4}}{r_4} \right) \right] \quad (\text{III-9})$$

Le calcul d'après les données des tableaux II et III montre que la variation d'énergie, donc aussi la surface S, est la plus grande avec la chaîne isotactique.

Le passage de C en D (figure 2) correspond à la transformation de la configuration des séquences non encore ionisées avec, pour les COOH concernés, diminution des énergies d'interaction. Plus précisément, comme il y a deux sortes de groupes, COO^- et COOH , on a :

$$G_e = \alpha \frac{\partial G_e}{\partial \alpha} + (1 - \alpha) \frac{\partial G_e}{\partial (1 - \alpha)} \quad (\text{III-10})$$

Le changement de configuration s'accompagne d'une diminution de l'énergie d'interaction des COOH avec leurs voisins :

$$d \left[\frac{\partial G_e}{\partial (1 - \alpha)} \right] < 0 \quad (\text{III-11})$$

Mais d'après la loi de Gibbs-Duhem :

$$\alpha d \left[\frac{\partial G_e}{\partial \alpha} \right] = - (1 - \alpha) d \left[\frac{\partial G_e}{\partial (1 - \alpha)} \right] \quad (\text{III-12})$$

et l'inégalité (III-11) fournit :

$$d\left[\frac{\partial G_e}{\partial \alpha}\right] > 0 \quad (\text{III-13})$$

ce qui rend compte de la transition CD.

En principe, le calcul des expressions (III-8) et (III-9) et la comparaison avec la valeur expérimentale de S devraient permettre de départager les acides iso et syndiotactique. Mais la comparaison quantitative est impossible à cause de l'ignorance de la valeur de la constante diélectrique D et la méconnaissance des énergies d'interaction entre charge et dipôle. On peut estimer que S_s est environ 2,5 fois plus petit que S_i . Si donc l'acide titré ici était isotactique, dans le cas du titrage d'un acide syndiotactique l'aire S_s serait environ deux fois plus petite, c'est-à-dire que l'arc BC se rapprocherait de BB' de telle sorte que la branche BE paraîtrait continue. Une conséquence immédiate est qu'il ne doit pas y avoir de "branche anormale" dans le titrage d'un polyacide où les molécules isotactiques sont en faible proportion devant les syndio et les atactiques. Effectivement, malgré des expériences attentives, nous n'avons décelé aucune anomalie dans le titrage de la solution non fractionnée d'acide polyacrylique. Il y a seulement un changement de pente net pour $\alpha = 0,25$ selon le tracé A B E de la figure 2.

C - CONCLUSION

Un autre élément en faveur de la structure isotactique du polyacide utilisé est son mode de préparation : fraction la moins soluble dans HCl. Or il est connu que l'acide polyméthacrylique isotactique par exemple est beaucoup moins soluble en milieu acide que les variétés syndiotactique ou atactique [10]. Le fractionnement par coacervation pourrait donc ne pas se faire uniquement selon le poids moléculaire. Cette question pourrait être élucidée par l'emploi de la résonance magnétique nucléaire [11].

Enfin deux derniers arguments sont en faveur de l'analyse présentée dans ce chapitre. Tout d'abord, la valeur de α_s dépend théoriquement de la force ionique par l'intermédiaire du coefficient d'écran $e^{-\kappa r}$. Pour $\mu = 0,05$, des calculs analogues aux précédents montrent qu'il faut considérer cinq voisins de chaque côté du groupe considéré d'où la valeur de $\alpha_s = \frac{1}{5+1} = 0,167$.

La courbe de variation du pK' en fonction de la proportion de groupes ionisés obtenue par Bourdais [12] pour l'acide polyacrylique et divers copolymères apparentés à $\mu = 0,05$ possède précisément deux parties distinctes AB et BE se coupant pour une valeur α_s voisine de 0,16. D'autre part, un raisonnement analogue au premier indique que la courbe de titrage n'est pas réversible et que la courbe de retour doit se situer au-dessus de la première quand l'ionisation rétrograde. L'expérience a vérifié cette déduction. La courbe de retour figure en tirets sur la figure 2.

Finalement, la théorie de la prépondérance des interactions des voisins rapprochés de Marcus et de Lifson est confirmée par ces expériences sur l'acide polyacrylique. Mais il y a une différence fondamentale entre ce dernier cas et celui de la gélatine. Dans le premier, il est raisonnablement impossible de limiter l'interaction des groupes à leurs deux voisins immédiats, même à $\mu = 0,5$, et, corrélativement, de supposer la géométrie moléculaire indépendante de α . Dans le second, la linéarité de pK' en fonction de α in-

dique que la force ionique est suffisante et l'augmentation du pH entraîne une variation normale du volume moléculaire mais non une modification profonde des interactions entre groupes voisins de la gélatine, ceux-ci étant plus éloignés que ceux de l'acide polyacrylique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BONToux J. - "La gélatine dans l'or colloïdal radioactif", Thèse, Montpellier, 1961.
- [2] ROQUE J. - "Mesures de pression osmotique d'un polyélectrolyte", Diplôme d'Etudes Supérieures, Montpellier, 1961.
- [3] CROUZAT-REYNES G. - Communication personnelle.
- [4] KATCHALSKY A. et SPITNIK P. - J. Polym. Sc. (1947), 2, 432.
- [5] KATCHALSKY A., SHAVIT N. et EISENBERG H. - J. Polym. Sc. (1954), 13, 69.
- [6] LIFSON S. - J. Polym. Sc. (1957), 25, 431.
- [7] FLORY P.J. - J. Polym. Sc. (1961), 49, 105.
- [8] LIFSON S. - J. Chem. Phys. (1958), 29, 80 et 89.
- [9] MORAWETZ H. dans RICE S.A. et NAGASAWA M. - "Polyelectrolyte Solutions", Academic Press., Londres, (1961), chapitre 5.
- [10] LOEBL E.M. et O'NEILL J.J. - J. Polym. Sc. (1960), 45, 538.
- [11] BOVEY F.A. et TIERS G.V.D. - J. Polym. Sc. (1960), 44, 173.
- [12] BOURDAIS J. - "Etude des polyélectrolytes en solution", Thèse, Paris, (1958).

CHAPITRE IV

GÉLATINES ESTÉRIFIÉES

La méthode qui a permis l'analyse des titrages de la gélatine et de l'acide polyacrylique peut être contrôlée en l'appliquant à l'étude de produits dérivés de la gélatine. Par exemple, nous avons modifié la gélatine par estérification des groupes carboxyle libres et utilisé le titrage acido-basique tant au point de vue analytique quantitatif qu'au point de vue électrochimique.

A - PREPARATION DES GELATINES ESTERIFIEES

1/ Données expérimentales

Parmi les nombreuses méthodes de blocage des fonctions acide carboxylique, nous avons choisi l'estérification en milieu acide parce qu'elle est simple et permet, avec une bonne sélectivité, de limiter au minimum la dégradation de la protéine [1, 2, 3]. La gélatine (décrite au chapitre II) sous la forme d'une poudre grossière est soumise à l'action du méthanol acidifié par l'acide perchlorique, à la température ambiante et avec agitation intermittente, pendant un laps de temps variable. Les échantillons, qui ont gonflé dans le milieu alcoolique, peuvent être simplement lavés au méthanol pur et séchés à l'air ou bien être débarrassés plus ou moins complètement de l'acide minéral par dialyse à la température ambiante ou à 2°C. Après cette purification, l'échantillon est récupéré sous forme solide, généralement par lyophilisation. Ces diverses spécifications sont indiquées au tableau I pour chaque échantillon.

Du point de vue analytique, la masse restreinte des échantillons préparés et les quantités assez importantes nécessaires à plusieurs titrages devant se contrôler mutuellement obligent en général à des micro-dosages. L'eau n'a été dosée par pesée comme au chapitre I que pour quelques échantillons. Pour les échantillons lyophilisés, nous avons dosé l'eau par distillation à 78°C sous une pression de 0,01 mm de mercure et récupération dans un condenseur plongé dans le mélange acétone-neige carbonique. L'appareil de micro-détermination d'eau Edwards (modèle MD A 2) utilisé permet de mesurer par une lecture de pression la quantité d'eau distillée en la ramenant sous forme gazeuse. La méthode a été mise au point au moyen d'un échantillon de gélatine dont l'humidité était connue d'après la première méthode citée ci-dessus. L'erreur absolue sur l'humidité H_e ne saurait être inférieure à 0,5 % dans nos conditions d'emploi.

L'azote est dosé par la méthode classique de kjeldahlisation [4]. Le catalyseur de digestion est l'oxyde mercurique; la distillation s'effectue à l'aide d'un appareil de Parnas et Wagner modifié de façon à permettre

l'entraînement directement dans le matras de minéralisation. L'indétermination sur le taux d'azote N_e , influencée par les difficultés spécifiques de pesée des échantillons lyophilisés, est de l'ordre de 0,2 %.

Pour évaluer le taux d'estérification de la gélatine, nous avons dosé le groupement méthoxyle par la méthode de Zeisel terminée par une micro-pesée d'iodure d'argent selon Pregl [5]. A l'expérience, cette méthode nous a semblé préférable à la méthode volumétrique de Vieböck et Brecher. Avec un laveur de gaz au sulfate de cadmium seul, les taux de méthoxyle t_e sont connus à $\pm 0,03$ % près. Contrairement à ce que la teneur moyenne de la gélatine en méthionine (5,4 résidus par 10^5 g) [6] et certains résultats de la littérature [7, 8] laissaient supposer, la gélatine non estérifiée n'a fourni aucun résultat positif et nous n'avons donc pas corrigé les résultats bruts.

Tableau I

Echantillon	Esterification		Purification	Analyses		
	Molarité en acide	Durée		Méthoxyle t_e %	Eau H_e %	Azote N_e %
A	0,1	12 jours	dialyse 2 jours à 20°C électrodialyse	1,73	5,1	15,42
B 1	0,1	10 jours	séchage à l'air	1,44	6,2	15,37
B 2			électrodialyse	0,63	14,1	15,41
C	0,05	15 jours	séchage à l'air	2,16	9,5	14,77
D	0,1	23 jours	dialyse 6 jours à 2°C lyophilisation	2,10	11,5	14,5
E	0,025	3 jours	dialyse 6 jours à 20°C lyophilisation	1,72	11,5	15,15
F	0,025	6 heures	dialyse 5 jours à 2°C lyophilisation	0,27	12,5	15,66
G	0,025	24 heures	dialyse 4 jours à 2°C lyophilisation	0,70	13,6	15,22

2/ Discussion des résultats analytiques

Indépendamment de toute considération cinétique, les données du tableau I font apparaître un fait singulier. Si l'on suppose que la seule modification de la gélatine est son estérification, le taux N d'azote corrigé de l'humidité expérimentale H_e doit se comparer au taux d'azote N' calculé sur la base de 18,36 % pour la gélatine de départ sèche avec la correction correspondante. La figure 1 montre une divergence considérable entre N et N' quand le taux d'estérification t augmente. Cette divergence ne peut être attribuée à la solvolysé des groupements amide de la gélatine dans le milieu d'estérification car le calcul montre qu'elle est disproportionnée avec la teneur de ceux-ci (environ 12 groupes pour 10^5 g de gélatine). Il est probable que les dosages d'eau doivent être mis en cause, avec une erreur augmentant avec l'estérification.

Ceci est explicable par une adsorption de l'eau relativement plus forte sur la gélatine estérifiée que sur la gélatine de départ. En effet les échantillons estérifiés sont plus facilement solubles dans l'eau, la plupart se dissolvent spontanément même à froid, ils gélifient difficilement et leurs solutions sont nettement moins visqueuses. Ces caractères indiquent une organisation moléculaire plus faible favorable à la fixation de molécules d'eau et confirmée apparemment par les spectres d'absorption infra-rouge. Nous avons en effet trouvé une augmentation d'environ 20 cm^{-1} du maximum d'absorption des vibrations de valence de NH et une diminution de 10 à 15 cm^{-1} pour la fréquence caractéristique des vibrations dites "de torsion de NH" vers 1540 cm^{-1} quand on passe de la gélatine initiale ou faiblement estérifiée (G) aux échantillons fortement estérifiés (C et D). Ces déplacements faibles sont interprétables par un certain affaiblissement des liaisons hydrogène [9]. Ces remarques soulignent donc une nouvelle fois la difficulté de définir expérimentalement la protéine sèche aussi bien que l'eau d'hydratation et nous calculerons l'humidité à partir du taux d'azote trouvé.

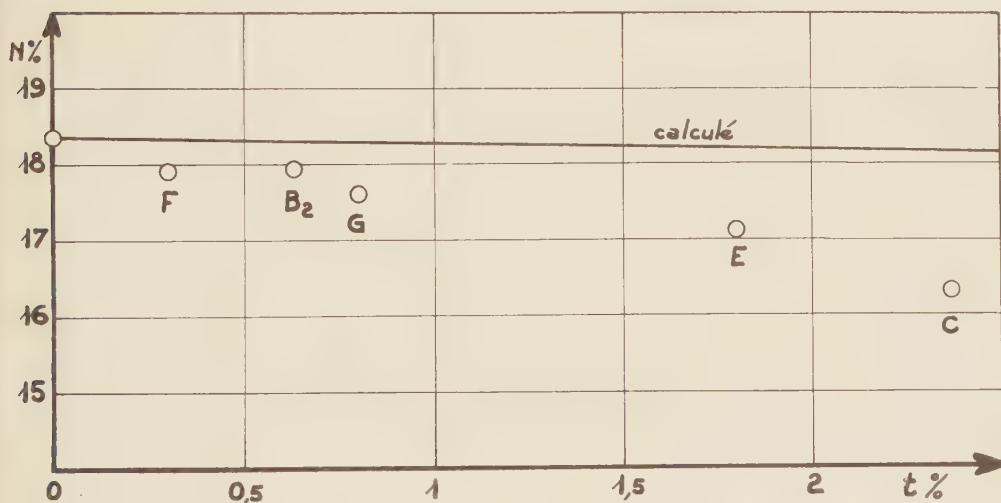


Figure IV-1 - Variation, en fonction du taux d'estérification, de la teneur en azote expérimentale et calculée.

B - DONNEES ANALYTIQUES ISSUES DES TITRAGES ACIDO-BASIQUES

1/ Les groupes carboxyles

La technique des dosages est celle du chapitre II. En milieu acide, la stabilité des échantillons estérifiés est bonne et l'analyse de la courbe de titrage au moyen de la fonction Y (équation II-10) a été faite pour tous les titrages. Les résultats du tableau II sont calculés sur la base de l'humidité H déduite du dosage de l'azote avec correction d'estérification et pour une masse conventionnelle de 10^5 g de gélatine.

Tableau II

Echantillons	A	B 1	B 2	C	D	E	G
Nombre de COOH prévu	40	54,5	87	21	20,5	32,5	85
m_1 par titrage	52	72	101	38	44	58	94,5
Ecart	+12	+17,5	+14	+17	+13,5	+25,5	+ 9,5

La différence entre le nombre de groupes méthoxyle et les 113 groupes COOH de la gélatine de départ fournit le nombre de COOH prévu, tandis que le titrage acido-basique indique un nombre m_1 . La comparaison fait ressortir des écarts considérables qui peuvent être attribués à la solvolysse d'une partie des groupes amide [10]. Mais cette réaction parasite contribue à la variation du taux d'azote. Les relations que l'on peut écrire entre taux d'azote, d'eau, d'estérification et nombre x de groupes amide détruits sont utilisées dans un calcul par approximations successives qui conduit rapidement aux résultats révisés du tableau III.

Tableau III

Echantillons	A	B 1	B 2	C	D	E	G
H %	14	14,6	14,8	17,5	18,9	15	16
Nombre de COOH prévu	45	58,5	89	28,5	29,5	48	86
m_1 par titrage	49	68	96	35	40	53,5	87,5
x	4	9,5	7	6,5	10,5	5,5	1,5

Conformément à l'hypothèse de la solvolysse des amides, x reste toujours inférieur à 12. Ces résultats obtenus par une voie détournée ne peuvent être précis comme le montre l'écart de x pour les échantillons B 1 et B 2. Ils montrent cependant que la méthode d'analyse des titrages acido-basiques fournit des résultats compatibles avec ceux des microdosages et les propriétés chimiques de la gélatine.

2/ Les groupes imidazoles

L'extension de l'analyse des titrages aux zones suivantes se heurte à l'instabilité des esters en milieu alcalin. La réversibilité est satisfaisante à 25°C jusque vers pH 7 alors qu'avec les échantillons les plus estérifiés (C par exemple) une dérive du pH est perceptible à 38°C dès pH 6. A 13°C l'hydrolyse est beaucoup plus lente mais alors la gélification du milieu entrave souvent le titrage. Non seulement la manipulation de ces produits réclame des précautions dans la préparation de la solution mais aussi les titrages doivent être effectués rapidement. Néanmoins il est possible de déterminer le nombre de groupes imidazoles compris entre 4,5 et 5 par 10^5 g de gélatine tant par étude itérative de la fonction Y que par détermination de l'enthalpie apparente d'ionisation au moyen de deux titrages à 25°C et 13°C par exemple [11]. On vérifie bien la spécificité de la méthode de modification de la protéine. Par contre le domaine d'ionisation des fonctions azotées plus basiques est interdit par l'hydrolyse des groupes esters.

C - DONNEES ELECTROCHIMIQUES ET STRUCTURALES

1/ Point isoionique et constante de dissociation

D'après la théorie simple des protéines, le titrage de la classe des groupes carboxyles par exemple obéit à une relation de la forme :

$$pH = pk'_1 + \log \frac{\bar{h}_1}{m_1 - \bar{h}_1} - 0,868 \omega \bar{Z} \quad (I-34)$$

C'est-à-dire que pour atteindre la valeur de la constante caractéristique pk'_1 , il faut connaître exactement celle de la charge $\bar{Z}$ et non point seulement sa variation. Autrement dit, il est nécessaire de déterminer le point isoionique pH_i . Comme il ressort de la théorie d'interaction entre voisins rapprochés et du chapitre II, pk'_1 obtenu dans ces conditions n'a pas la signification particulière que lui attribue la première théorie. Nous ne donnons donc pas les diverses valeurs auxquelles conduisent les titrages des échantillons estérifiés [11]. Sauf les exceptions dont il va être question au prochain paragraphe, les constantes expérimentales $pk'_{a=0}$ ont une valeur de $4,03 \pm 0,05$, identique à celle de la protéine de départ. D'ailleurs l'expérience prouve qu'il est impossible d'atteindre et donc de déterminer le pH_i pour la majorité des échantillons. En effet celui-ci est d'autant plus élevé que le produit est plus estérifié et, malgré une technique d'électrodialyse très rapide, il est impossible d'éviter l'hydrolyse. La protéine est électrodialysée dans une cellule spéciale ayant la forme d'un petit cylindre de verre de 20 mm de long fermé aux deux extrémités par les membranes de cellophane qui séparent ce compartiment des électrodes de platine baignant dans l'eau distillée froide constamment renouvelée. Le champ est de l'ordre de 200 volts/cm. L'intensité est enregistrée en fonction du temps, ce qui permet d'arrêter l'opération dès qu'elle est terminée soit après environ deux heures pour 60 mg de protéine. Certains auteurs qui déminéralisent par échange d'ions à 40°C [8] ne peuvent avoir de meilleurs résultats. Cependant le pH_i est expérimentalement déterminable pour les produits à plus faibles taux d'estérification comme le prouve le parfait accord de nos valeurs pour B 2 et G avec celles de Kenchington et Ward dans ce cas. Sur la figure 2 le nombre total de groupes COOH possibles a été pris égal à 125 et le fait que le point représentant le collagène [12] s'aligne bien avec la courbe indique que la nature chimique du blocage des COOH n'influe pas sur le pH_i .

2/ Variation du facteur électrostatique ω et topochimie

D'après ce qui précède, l'étude du facteur d'interaction électrostatique est limitée à la zone de dissociation des COOH. Lorsque la valeur de m_1 est connue pour un échantillon donné, la façon la plus commode et objective de déterminer ω est d'étudier la variation de pK' selon :

$$pK' = pH - \log \frac{\bar{h}_1}{m_1 - \bar{h}_1} = pk'_1 - 0,868 \omega \bar{Z} \quad (II-11)$$

ou encore :

$$pK' = \text{constante} + 0,868 \omega \bar{h} \quad (IV-1)$$

La pente de ces diagrammes linéaires $pK' = f(\bar{h})$ fournit les valeurs de ω rassemblées dans le tableau IV pour quelques titrages.

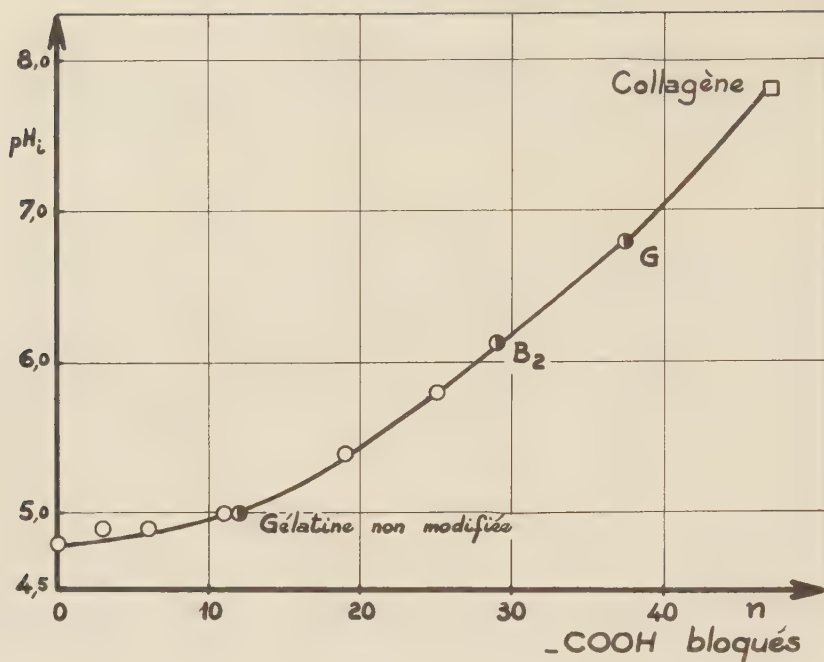


Figure IV-2 - Variation du pH_i en fonction du nombre n de COOH bloqués par 10^5 g de gélatine; cercles barrés : nos résultats, cercles vides : résultats de Kenchington et Ward.

Tableau IV

Echantillons	Nombre de COOH par 10^5 g	w
Gélatine	113	0,0030
B 2	96	0,0063
G	87,5	0,0041
B 1	68	0,0048
E	{ 53,5	0,0083
	{ 54	0,0081
A	49	0,0096
D	40	0,0090
	{ 34	0,0101
C	{ 34	0,0097
	{ 37	0,0097

La figure 3 représente la variation de w avec m_1 . Si l'on accepte la signification que donne à w la théorie simplifiée exposée au chapitre I et dont l'expression est :

$$w = \frac{N \epsilon^2}{2 D R T} \left(\frac{1}{b} - \frac{\kappa}{1 + \kappa a} \right) \quad (I-27)$$

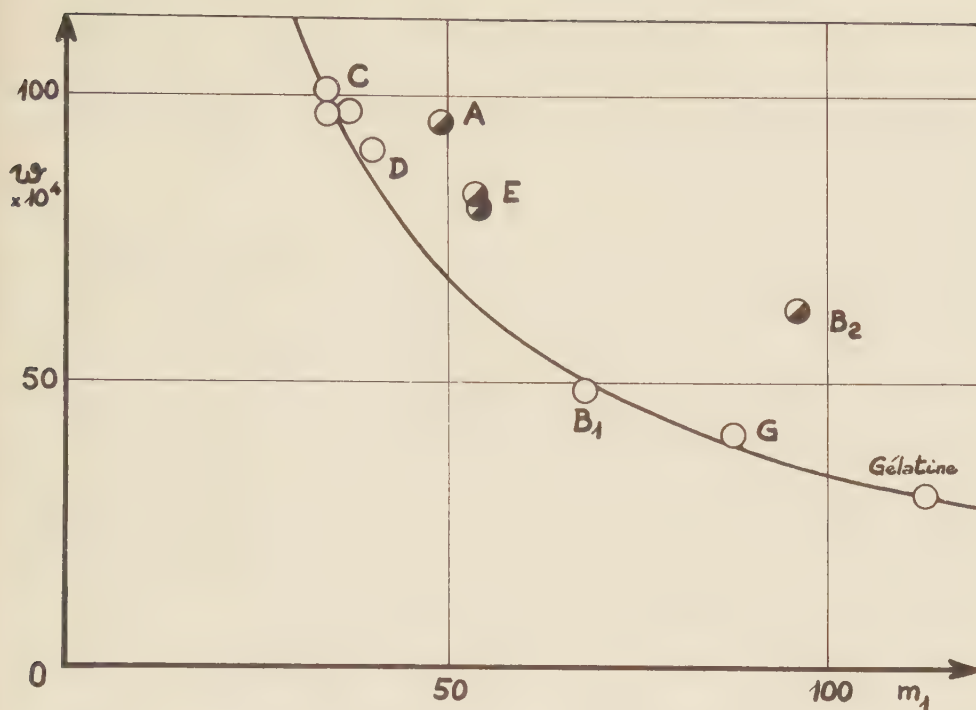


Figure IV-3 - Variation du facteur électrostatique avec le nombre de groupes carboxyle.

ses variations doivent traduire une déformation de la molécule. Ainsi l'estérification de quelques fonctions COOH aurait pour conséquence de diminuer l'extension moléculaire, hypothèse défendable en soi [11] mais opposée à l'argumentation du début de ce chapitre, et surtout cette extension varierait d'une façon imprévisible avec le taux de blocage des COOH. Mais en abandonnant encore une fois cette théorie pour celle plus satisfaisante des polyélectrolytes linéaires, on a déjà vu que w avait une autre signification et, comme pour l'acide polyacrylique, on est ramené à un problème de topochimie puisqu'il s'agit de considérer les phénomènes au niveau même du groupe et non plus de la molécule globale. Suivant le schéma proposé, la gélatine est électrochimiquement équivalente à un polyacide carboxylique homogène en ce qui concerne sa fonction acide. Le schéma le plus simple d'estérification conduira à des séquences de polyester intercalées avec des séquences de polyacide. Dans ces conditions les caractères électrochimiques de la fonction acide doivent demeurer inchangés et, en particulier, l'importance de l'interaction électrique des groupes proportionnelle à w doit rester constante. Celle-ci, donnée par le terme $0,868 w h$ dans l'équation (IV-1), dépend de la valeur absolue de h c'est-à-dire du nombre total m_1 de COOH. Pour comparer les échantillons avec m_1 variable, on peut écrire, en accord avec les équations (II-3) et (III-1 bis) :

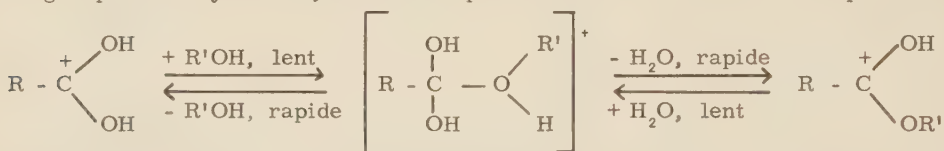
$$0,868 \, \omega \bar{h} = 0,868 \, \omega m_1 \alpha = \varphi \alpha \quad (\text{IV-2})$$

dans laquelle le facteur d'interaction φ doit être constant. On peut prendre pour base la valeur $\omega = 0,0030$ pour $m_1 = 113$ de la gélatine non modifiée et le point représentatif d'un diagramme $\omega = f(m_1)$ doit se déplacer sur une hyperbole équilatère définie par :

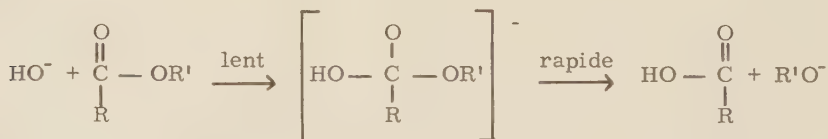
$$\omega m_1 = 0,339 \quad (\text{IV-3})$$

C'est la courbe en trait plein de la figure 3 qui justifie l'allure générale de la variation pour le plus grand nombre de cas. Mais certains points (cercles barrés sur la figure 3) n'obéissent visiblement pas à cette loi, et ils ne doivent donc pas relever de la même topochimie. L'examen du tableau I montre que ces points se rapportent à des échantillons qui ont pu être soumis à une hydrolyse partielle des groupes esters du fait d'une dialyse prolongée à température trop élevée ou d'une électrodialyse. Le cas le plus remarquable est B 2 qui est indiscutablement un produit d'hydrolyse de B 1.

Dans l'estérification en milieu méthanolique acide, par exemple selon un mécanisme $A_{Ac}2$ où l'attaque de l'alcool a lieu sur l'ion acide conjugué du groupe carboxyle [13], les effets polaires sont très difficiles à prévoir :



Néanmoins comme la réaction inverse d'hydrolyse de l'ester en milieu acide est très favorisée par l'augmentation du nombre de COOH voisins [14], l'estérification se produit certainement par progression de part et d'autre du point de première attaque. Enfin les facteurs purement stériques sont ici très importants. Les préparations de gélatines estérifiées ont lieu en milieu hétérogène puisque la gélatine est insoluble dans le méthanol. L'attaque de celui-ci ne peut se développer normalement qu'à la surface de la phase solide, certaines portions du polyacide sont estérifiées entièrement alors que d'autres, inaccessibles, demeurent intactes. Par contre l'hydrolyse en milieu alcalin d'un ester fait intervenir la formation d'un anion intermédiaire (mécanisme $B_{Ac}2$) et l'effet inhibiteur d'un champ électrostatique négatif est bien connu :



L'hydrolyse d'un polyester régulier doit donc mener à des groupes COOH intercalés avec des groupes COOCH₃ [15, 16]. Dans le cas actuel, les effets polaires sont probablement les seuls importants car la réaction a alors lieu en phase homogène contrairement à l'estérification. Il peut ainsi y avoir création d'un type nouveau de polyélectrolyte dans lequel on peut considérer une première classe de COOH identiques à ceux de la gélatine de départ et une deuxième classe de COOH espacés par des groupes esters et donc électrochimiquement différents des premiers. En particulier leur ionisation n'est pas influencée par l'ionisation d'autres groupes.

Par exemple :

Séquence carboxylique non modifiée :



Séquence partiellement estérifiée :



La même séquence après hydrolyse partielle :



Le cas le plus intéressant à examiner est celui des échantillons B 1 et B 2, puisque ce dernier est obtenu par l'hydrolyse du premier. Les courbes de titrage sont portées sur la figure 4 sous la forme $pK' = f(\alpha)$ pour que la comparaison directe soit possible entre des produits de m_1 différents. Tous les échantillons possédant des COOH de même type que B 1 doivent

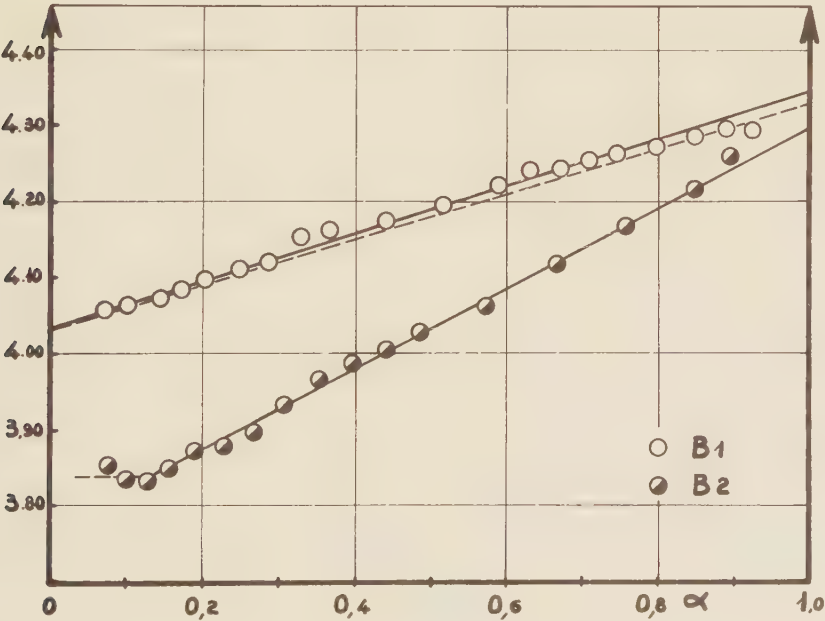


Figure IV-4 - Cas des échantillons B 1 et B 2.

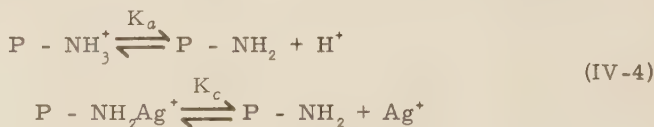
donner des droites voisines d'après l'équation (IV-2) (en tirets, cas de la gélatine non modifiée). La courbe relative à B 2 montre qu'à α faible, les COOH sont plus acides que ceux de B 1 pour être sensiblement équivalents à ceux-ci en fin de titrage. L'interprétation proposée est la suivante : les groupes COOH voisins le long de la chaîne polypeptidique peuvent avoir des interactions dipôle-dipôle amenant à la formation de liaisons hydrogène doubles [17] alors que les COOH espacés par des groupes esters ne peuvent former les mêmes liaisons qu'avec des parties éloignées de la même chaîne ou des chaînes différentes, au prix d'une diminution importante d'entropie. Ces groupes carboxyle ont ainsi une constante d'ionisation pK' indépendante de α et inférieure à $pK'_{\alpha=0} = 4,03$. L'étude de la distribution possible de 28 COOH formés par hydrolyse dans une suite de 54 groupes esters montre que le nombre de COOH isolés sera compris entre 26 et 8. Ces groupes doivent s'ioniser les premiers lors du titrage mais leur nombre et le $\Delta pK'$ sont assez faibles pour que n'apparaissent pas nettement deux zones de dissociation, la forme de la courbe expérimentale étant mal connue quand α tend vers zéro.

D - APPLICATION - COMBINAISON DE L'ION Ag^+ AVEC LA GELATINE

L'étude de l'interaction de la gélatine et de l'ion Ag^+ en solution, suggérée en particulier par l'observation du phénomène de Liesegang [18], a été abordée selon deux voies indépendantes : l'équilibre de diffusion de Ag^+ entre une solution et un gel de gélatine à basse température et la mesure électrométrique de l'activité de Ag^+ en présence de gélatine en solution, la forme ionique étant constante et égale à 0,5 dans tous les cas.

La méthode de l'équilibre de répartition de Ag^+ entre un gel et une solution dépourvue de gélatine a servi à mettre en évidence "la combinaison" de l'ion à la protéine. Le schéma de la manipulation est le suivant : 5 cm³ de gélatine de pH connu à 5 % dans NO_3K 0,5 M sont placés dans un récipient assez large et gélifiés. On verse ensuite par exemple 10 cm³ d'une solution de concentration connue en NO_3Ag et 0,5 molaire en NO_3K . Le récipient bouché est conservé 12 à 15 jours à 2°. La concentration en NO_3Ag de la solution est alors déterminée par dosage colorimétrique à la dithizone; elle varie de $3 \cdot 10^{-4}$ à $8 \cdot 10^{-3}$ mole par litre environ. La force ionique élevée éliminant tout déséquilibre dû au potentiel de Donnan (vérifiable à pH inférieur à 3), la mesure de la concentration en Ag^+ dans la solution à l'équilibre permet de calculer la quantité d'ion argent combiné. Celle-ci augmente naturellement à un pH donné avec la concentration totale en ion Ag^+ et le système évolue vers un état de pseudo-saturation. La quantité de Ag^+ combiné maximum ainsi décelée croît quand le pH du gel augmente. D'autre part, pour un gel donné, on voit en mesurant le pH quand on augmente la concentration de nitrate d'argent que la "combinaison" de Ag^+ s'accompagne d'une libération parallèle d'ions H^+ .

Ces phénomènes, considérés qualitativement, sont cohérents et suggèrent la complexion de Ag^+ par l'azote des ammoniums quaternaires de la protéine selon le schéma :



où P désigne la chaîne protéique.

Cependant cette méthode est d'un emploi assez difficile sous la forme où nous l'avons mise en œuvre : concentrations déterminées par des dosages lents, gonflement possible du gel, passage probable de certaines molécules de gélatine en solution, difficulté d'atteindre des pH élevés. C'est pourquoi le même problème a été étudié par la méthode électrométrique [19].

La mesure du potentiel d'une électrode réversible $\text{Ag} - \text{AgCl}$ permet de connaître avec précision les variations d'activité de l'ion Ag^+ . Dans la mesure où la force ionique est constante et élevée, on peut les assimiler aux variations de concentration en ion argent libre. Ces mesures peuvent se faire de deux manières différentes : titrage par la potasse d'une solution de gélatine et de nitrate d'argent en concentration donnée ou bien addition graduelle de nitrate d'argent à une solution de gélatine ayant un pH déterminé à volonté au départ. Dans chaque cas, on mesure à 25°C les potentiels à l'électrode de verre et à l'électrode d'argent. Les titrages sont réversibles.

Soient c_1 la concentration stoechiométrique du nitrate d'argent et c_2 la concentration en Ag^+ libre. Dans le premier cas du titrage argentimétrique et acido-basique combiné, nous effectuons un titrage en absence de gélatine destiné à tenir compte des influences étrangères à celle-ci comme la variation du potentiel de jonction ou la précipitation de Ag_2O . La force électromotrice mesurée est E_1 . Puis le titrage en présence de gélatine fournit les valeurs de E_2 . On peut écrire :

$$\log \frac{c_1}{c_2} = \frac{1}{\beta} (E_1 - E_2) \quad (\text{IV-5})$$

Dans le second cas, c_2 est calculé simplement par :

$$E_2 = E'_0 + \beta \log c_2 \quad (\text{IV-6})$$

Les coefficients E'_0 et β se déduisent de mesures de force électromotrice en fonction de c_1 dans NO_3K 0,5 m. La variation est parfaitement linéaire dans chaque cas sauf aux dilutions extrêmes où la solution est tamponnée par la solubilité du chlorure d'argent. C'est l'origine du terme correctif $\frac{s}{c_2}$ de l'équation (IV-9) et du tableau V, avec $s = 1,84 \cdot 10^{-10} \text{ mole}^2/\text{litre}^2$. Nous avons trouvé par exemple $E'_0 = 0,5345 \text{ V}$ et $\beta = 0,0605$.

La première méthode a été utilisée pour avoir une allure globale des phénomènes qui permette de suggérer un mécanisme (figure 5), la seconde dans le but d'étudier quantitativement la combinaison de Ag^+ en fonction d'un excès variable d'ion argent libre à diverses valeurs du pH. Notons que l'on ne peut tamponner la solution à chacun de ces pH sans introduire de nouvelles espèces ioniques susceptibles de compliquer encore le système.

Sur la figure 5, la courbe a représente le nombre moyen $\bar{v}$ d'ions argent combinés à 10^5 g de gélatine. L'indétermination sur $\bar{v}$ ne dépasse pas 0,05. Une première zone de combinaison se dessine jusque vers pH 6,5 et une seconde aux pH supérieurs est rapidement obscurcie par la précipitation de l'oxyde d'argent. La valeur de $\bar{v}$ voisine de 4,5 à pH 6,5 et la position de la première partie de la courbe de combinaison dans l'échelle de pH montrent que les groupes mis en jeu dans l'équation (IV-4) sont les groupes imidazole de l'histidine dont le nombre est précisément de 4,5 par 10^5 g de gélatine (chapitre II) et $\text{pK}'_a = 6,90$. Effectivement, la courbe de dissociation du proton est déplacée dans la zone de dissociation de l'imidazole et nous avons vérifié que le rapport $\Delta \bar{h}/\bar{v}$ est voisin de un, aux erreurs expérimentales près.

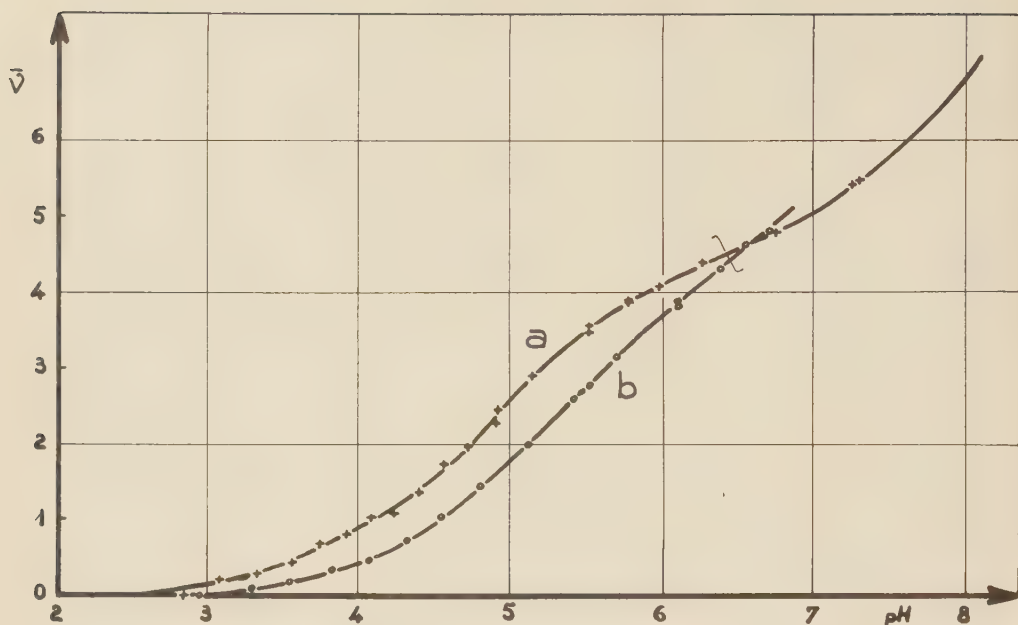


Figure IV-5 - Combinaison de l'ion argent avec la gélatine.

On peut donc écrire à partir des équations (IV-4) :

$$K'_a = \frac{[P - NH_2] (H^+)}{[P - NH_3^+]} = k'_a e^{2wz} \quad (IV-7)$$

$$K'_c = \frac{[P - NH_2] (Ag^+)}{[P - NH_2 Ag^+]} = k'_c e^{2wz} \quad (IV-8)$$

où les k' et K' sont ici encore des constantes apparentes respectivement intrinsèque et expérimentale. Si les mesures sont conduites sur un faible intervalle de pH, comme c'est le cas dans la seconde méthode électrométrique, le terme électrostatique exponentiel varie peu et le calcul approché peut être fait avec les K' . L'expérience donne :

$$[P - NH_2 Ag^+] = c_1 - c_2 - \frac{S}{c_2} \quad (IV-9)$$

et pour le cas du titrage du tableau V par exemple, on a :

$$\frac{\bar{V}}{V} = \frac{[P - NH_2 Ag^+] \cdot (50 + V)}{2,08} \quad (IV-10)$$

Tableau V
Titrage par NO₃Ag de 50 cm³ de solution de gélatine

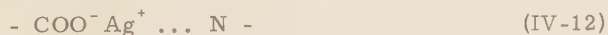
NO ₃ Ag V cm ³	c ₁ × 10 ³	E' volt	c ₂ × 10 ³	s/c ₂ × 10 ³	$\bar{v}$	pH	Y'
0,062	0,124	0,2628	0,0323	0,0057	0,236	5,10	4,679
0,095	0,190	0,2783	0,0583	0,0032	0,326	5,095	3,622
0,143	0,285	0,2944	0,1075	0,0017	0,441	5,09	2,690
0,192	0,383	0,3054	0,1635	0,0011	0,533	5,085	2,161
0,274	0,545	0,3183	0,267	0,0007	0,674	5,08	1,696
0,370	0,735	0,3289	0,400	0,0005	0,814	5,08	1,367
0,470	0,931	0,3368	0,540	ε	0,952	5,07	1,209
0,615	1,215	0,3457	0,758		1,117	5,065	1,022
0,748	1,475	0,3518	0,955 ⁵		1,248	5,065	0,907
0,863	1,696	0,3563	1,134		1,378	5,06	0,854
0,992	1,947	0,3606	1,335		1,506	5,055	0,801
1,192	2,330	0,3661	1,647		1,68	5,05	0,732
1,505	2,920	0,3730	2,141		1,937	5,045	0,657
1,810	2,490	0,3784	2,630		2,15	5,04	0,600
2,005	3,850	0,3814	2,948		2,26	5,03	0,575
2,305	4,410	0,3853	3,419		2,498	5,03	0,549
2,618	4,970	0,3888	3,907		2,69	5,03	0,517
2,998	5,650	0,3926	4,515		2,89	5,025	0,486
3,310	6,210	0,3953	5,003		3,11	5,02	0,478
3,710	6,900	0,3983	5,608		3,34 ⁵	5,015	0,464
4,010	7,420	0,4004	6,073		3,51 ⁸	5,015	0,450
5,01	9,10	0,4061	7,546		4,11 ⁵	5,005	0,433
5,995	10,71	0,4109	9,060		4,46	4,995	0,400

Dans ces conditions, si n est le nombre de groupes azotés intéressés, les équations (IV-7) et (IV-8) mènent à :

$$Y' = \frac{\bar{v}}{(Ag^+)} \left(1 + \frac{(H_a^+)}{K'_a} \right) = \frac{1}{K'_c} (n - \bar{v}) \quad (IV-11)$$

Le premier membre Y' de cette équation doit varier linéairement avec $\bar{v}$, avec les coordonnées à l'origine n/K' et n. La figure 6 est construite avec les données du tableau V relatives à un titrage par NO₃Ag à un pH variant de 5,10 à 5,0 où les groupes azotés autres que l'imidazole ne doivent pas intervenir. Elle montre que le schéma proposé doit être modifié. On pourrait essayer de justifier les phénomènes par l'intervention de plusieurs classes de groupes complexants de nombre et de pK'_c judicieusement choisis [20, 21, 22]. Mais l'emploi de gélatines à groupements bloqués permet de contrôler l'hypothèse de base. Nous avons effectué le titrage en présence de NO₃Ag d'un échantillon de gélatine estérifiée (C).

Le blocage d'un peu moins des trois quarts des groupes carboxyle a une influence importante sur la combinaison des ions argent (figure 5, courbe b). Donc le schéma (IV-4) est incorrect et l'examen de la figure 5 nous conduit à penser que la coordinence 2 de Ag⁺ est partiellement satisfaite par formation d'un chélate de la forme [19] :



Des polydentates de cette forme sont connus entre les métaux et les amino-acides. D'autre part, nous avons examiné l'absorption ultraviolette de la l-histidine en présence de nitrate d'argent : elle est caractérisée par la présence d'un maximum à 2 400 Å. Pour la gélatine isoionique en présence de NO_3Ag , nous trouvons un maximum très net d'absorption vers 2 500 Å, assez difficile à préciser à cause de la variation de la lumière diffusée à température trop basse. Ceci nous paraît justifier encore l'intervention des groupes imidazole comme groupes azotés donneurs dans (IV-12). Si $P_{(1)}$ désigne un site de la classe 1 (carboxyles) et $P_{(2)}$, un site de la classe 2 (imidazoles), la dissociation du chélate (IV-12), au voisinage du point isoionique où le terme électrostatique peut être négligé, est mesurée par :

$$K'_c = \frac{[P_{(1)}] \cdot [P_{(2)}] \cdot (\text{Ag}^+)}{[P_{(1)} \text{ Ag} - P_{(2)}]} \quad (\text{IV-13})$$

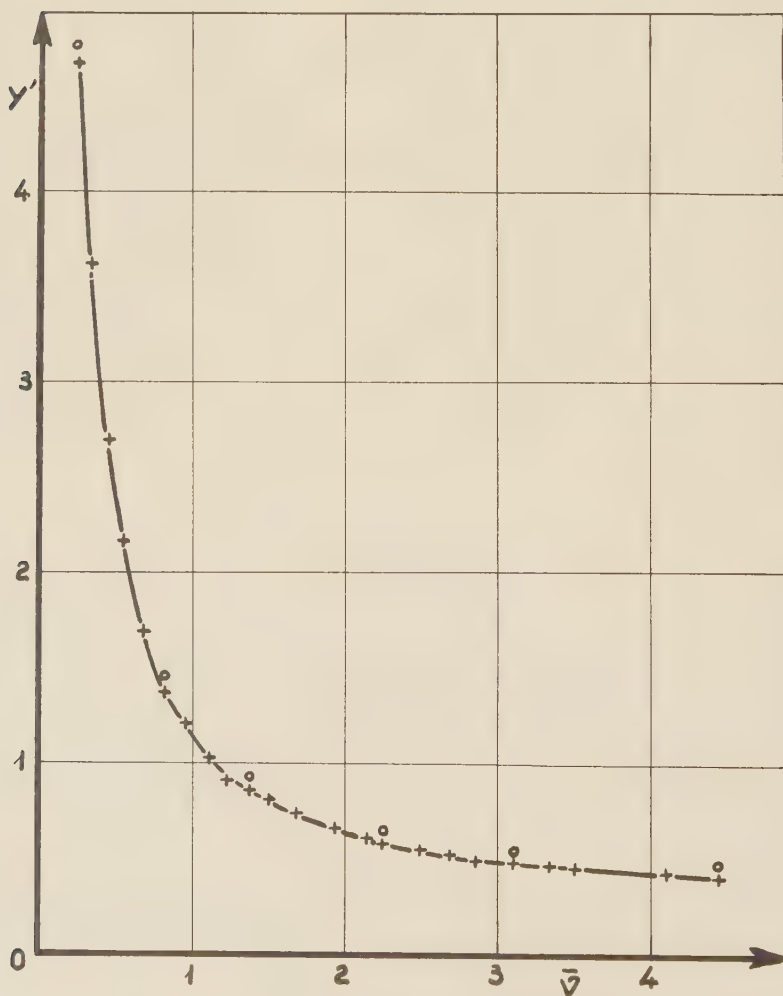


Figure IV-6 - Variation de la fonction Y' .

en concurrence avec les phénomènes acido-basiques exprimés par :

$$K'_{a1} = \frac{[P_{(1)}^-] (H^+)}{[P_{(1)}] [H]} \quad (IV-14)$$

et

$$K'_{a2} = \frac{[P_{(2)}] (H^+)}{[P_{(2)}^-] [H]}$$

Ces équations conduisent directement à :

$$\frac{\bar{v}}{(Ag^+)} \left(1 + \frac{(H^+)}{K'_{a2}} \right) \cdot \frac{1 + \frac{(H^+)}{K'_{a1}}}{m_1 - \bar{v}} = \frac{1}{K'_c} (m_2 - \bar{v}) \quad (IV-15)$$

qui n'est autre que l'équation (IV-11) où le premier membre est corrigé par un facteur facile à calculer. Pour le cas du tableau V où pK'_{a1} est égal à 4,28, quelques valeurs du premier membre de (IV-15) sont portées sur la figure 6 à une échelle convenable (cercles). Il est évident que l'hypothèse simple de l'intervention simultanée des groupes carboxyle et imidazole ne suffit pas à rendre compte des phénomènes.

Mais dans 'le cas de la gélatine, d'après nos conceptions les groupes concernés sont éloignés et la formation d'un tel complexe pontant des groupes distants ne peut être analysée avec les méthodes valables dans le cas d'ions monovalents simples [23, 24, 25]. Une indication possible du pontage est l'augmentation très nette de la lumière diffusée lorsque la solution de gélatine contient du nitrate d'argent. La formation du complexe à l'argent ne pourrait alors se faire qu'avec diminution de la constante d'association au fur et à mesure qu'elle progresse, conformément à l'expérience. Cela revient bien à dire que tous les sites de complexion de Ag^+ ne sont pas équivalents. Mais chercher par approximations successives un ensemble de paramètres (nombre de groupes et constantes de dissociation) susceptibles de permettre de reconstruire la courbe de combinaison expérimentale ne repose sur aucune réalité physique.

En conclusion, il est probable que l'ion Ag^+ forme avec la gélatine un complexe du type (IV-12) créant des ponts intra ou intermoléculaires et que les théories actuelles ne permettent pas d'étudier thermodynamiquement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FRAENKEL-CONRAT H. et OLCOTT H.S. - J. Biol. Chem. (1945), 161, 259.
- [2] PUTNAM F.W. - "The Proteins" éditeurs Neurath et Bailey, Academic Press., New York, (1953), volume 1B, chapitre 10.
- [3] GUSTAVSON K.H. - "The chemistry and reactivity of collagen", Academic Press., New York, (1956), p.254.
- [4] STEYERMARK A. - "Quantitative organic microanalysis" Blakiston Company, New York, (1951), chapitre 9.

- [5] ELEK A. dans "Organic Analysis" Interscience Pub., New York (1953), Volume 1, p. 67.
- [6] EASTOE J.E. et LEACH A.A. - "Recent Advances in Gelatin and Glue Research", éditeur G. Stainsby, Pergamon Press., Londres (1958), p. 173.
- [7] LARSSON A. et GUSTAVSON K.H. - J. Soc. Leather Trad. Chem. (1955), 39, 107.
- [8] KENCHINGTON A.W. - Biochem. J. (1958), 68, 458.
- [9] PIMENTEL G.C. et Mc CLELLAN - "The Hydrogen Bond", W.H. Freeman, Londres, (1960), chapitre 3.
- [10] CHIBNALL A.C., MANGAN J.L. et REES M.W. - Biochem. J. (1958), 68, 114.
- [11] COMBET S. - 86^e Congrès National des Sociétés Savantes, Résumé des communications (1961), sous presse.
- [12] HIGHBERGER J. - J. Am. Chem. Soc. (1939), 61, 2302.
- [13] GOULD E.S. - "Mechanism and Structure in Organic Chemistry" Holt, Rinchart et Winston, New York (1959), chapitre 9.
- [14] DE LOECKER W. et SMETS G. - J. Polym. Sc. (1959), 40, 203.
- [15] KAWABE H. et YANAGITA M. - (1959), Chem. Abst. 54, 15995 c.
- [16] ZIMMERING P.E. et WESTHEAD E.W. - Biochem. Biophys. Acta, (1957), 25, 376.
- [17] HANBY W.E., WALEY S.G. et WATSON J. - J. Chem. Soc. (1950), 3239.
- [18] COMBET S. et HAMDIKEN F. - J. Chim. Phys. (1954), 51, 18.
- [19] SALVINIEN J. et COMBET S. - Comptes Rendus Acad. Sc. (1956), 242, 247.
- [20] SCATCHARD G., SCHEINBERG I.H. et ARMSTRONG S.H. - J. Am. Chem. Soc. (1950), 72, 540.
- [21] LAL H. et RAO M.S.N. - J. Am. Chem. Soc. (1957), 79, 3051.
- [22] SAIFER A. et STAIGMAN J. - J. Phys. Chem. (1961), 65, 141.
- [23] KOTLIAR A.M. et MORAWETZ H. - J. Am. Chem. Soc. (1955), 77, 3692.
- [24] MANDEL M. et LEYTE J.C. - J. Polym. Sc. (1962), 56, S 23.
- [25] GURD F.R.N. et WILCOX P.E. - Adv. Prot. Chem. (1956), 11, 311.

CONCLUSION

L'exposé des théories des solutions de polyélectrolytes qui occupe le premier chapitre s'articule autour de deux idées générales. En premier lieu, il précise la thermodynamique classique de ces solutions qui étaient hier encore assez mal connues si bien que l'on attribuait certaines de leurs propriétés insolites à des facteurs spécifiques, mal définis et d'ailleurs incontrôlables dans la majorité des cas. De nombreux travaux poursuivis dans des voies souvent indépendantes à première vue nous permettent maintenant d'établir l'unité de la fonction polyacide aussi bien pour les hauts polymères artificiels que pour les protéines. Cependant, à la lecture de plusieurs mémoires, il nous a paru indispensable de présenter plus nettement le raisonnement utilisé, la nature des diverses constantes, intrinsèque ou expérimentale, vraie ou apparente, ainsi que les postulats, les limites et les critiques possibles. Ces précisions trouvent naturellement leur justification dans la comparaison des propriétés électrochimiques des poly-électrolytes avec celles des électrolytes simples de même fonction chimique qui est la seconde idée directrice du premier chapitre. Ainsi il est facile de prévoir que, contrairement à l'électrochimie classique des petits ions, l'étude des polyélectrolytes est simplifiée par l'emploi de milieux de force ionique élevée : l'effet de blindage électrostatique qui en résulte limite l'environnement efficace de chaque groupe ionisé à un très petit nombre d'autres groupes. Par la prépondérance des interactions des groupes voisins, nous retrouvons dans les propriétés des polyacides celles des monoacides, des diacides ou des triacides selon le cas.

Les trois autres chapitres sont en quelque sorte l'application de ces généralités. Ainsi le chapitre II établit une méthode objective d'analyse quantitative des données de titrage acido-basique pour la gélatine et les molécules voisines. Cette méthode, qui peut ne pas s'appliquer à certaines protéines soumises à de profondes transformations moléculaires, non seulement nous a permis de donner des résultats analytiques très corrects mais aussi nous a suggéré une certaine forme de structure primaire de la gélatine : les groupes carboxyle latéraux seraient disposés en séquences homogènes, les groupes azotés basiques constituant aussi des séquences homogènes de polybases.

Le cas d'un polyacide carboxylique régulier est donc ainsi naturellement envisagé dans le chapitre III, avec les mêmes méthodes. L'acide polyacrylique s'y révèle un polyacide moins simple que la gélatine ce qui est normal puisque ses groupes acides sont singulièrement plus rapprochés. L'étude de leurs interactions nous a conduit à révéler une topochimie particulière et assez curieuse qui provoque un changement de configuration de la chaîne

dans un domaine délimité de rapport de neutralisation. Ainsi, se trouvent expliqués les accidents des courbes de titrage observables non seulement dans nos expériences mais également dans d'autres travaux où les conditions expérimentales étaient différentes. Ceci constitue une justification *a posteriori* de nos déductions théoriques concernant la structure. D'autre part, nous pensons que la forme globale des molécules ne joue qu'un rôle très secondaire dans les propriétés électrochimiques à la force ionique employée.

Cette prépondérance des phénomènes à l'échelle du groupe étudié et non de l'ensemble de la molécule ainsi que le caractère topochimique des réactions sont exploités dans l'étude des gélamines estérifiées, objet du chapitre IV. Sur la base des résultats du chapitre II, les propriétés acidobasiques des gélamines estérifiées sont explicables par deux phénomènes spéciaux : l'estérification s'effectue par séquences ou fractions de séquences homogènes tandis que l'hydrolyse partielle crée un deuxième type de groupes carboxyle intercalés par des groupes ester résiduels. Enfin nous avons placé en fin du chapitre IV un résumé de l'étude de l'interaction de la gélamine et de l'ion argent. Le blocage partiel des COOH dans la gélamine estérifiée nous permet de démontrer l'intervention de ceux-ci dans le phénomène de combinaison de Ag^+ . La gélamine apparaît alors comme un agent complexant bifonctionnel. Nous démontrons que, toujours d'après les conclusions du chapitre II, lorsque ces "sites" complexants sont éloignés sur la molécule, les méthodes d'analyse classiques pour des ions monovalents comme le proton ne conviennent pas pour un ion comme Ag^+ susceptible de ponter des parties éloignées de la molécule, une partie importante de l'enthalpie libre de la réaction étant alors d'origine conformationnelle ou entropique.

En conclusion générale, nous pouvons dire que l'emploi des théories modernes des polyélectrolytes synthétiques s'est avéré particulièrement efficace dans l'étude des équilibres de dissociation de la gélamine. Il permet en quelque sorte de compléter la description quantitative des mesures par un aperçu assez détaillé des réactions au niveau des groupements d'atomes intéressés. Il est probable que les propriétés d'autres protéines pourraient être envisagées de la même façon en conjugant les résultats d'origines analytique, biologique et électrochimique.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	7
CHAPITRE I - PROTEINES ET POLYELECTROLYTES; ASPECTS THEORIQUES DE L'ELECTROCHIMIE DES SOLUTIONS	9
A - Théorie simples des protéines globulaires	9
1/ Equilibres multiples dans le cas idéal	9
2/ Modèle moléculaire à symétrie sphérique avec inter- actions électrostatiques	12
3/ Discussion	15
B - Théories générales des polyélectrolytes	18
Discussion :	
a) Le potentiel moléculaire ψ	23
b) Les énergies d'interaction entre groupes	25
c) Cas des polyacides à structure irrégulière et des polyampholytes	27
C - Conclusion	27
Bibliographie	28
CHAPITRE II - PROPRIETES ACIDO-BASIQUES DE LA GELATINE	31
A - Méthode expérimentale	31
1/ Produits et réactifs	31
2/ Appareillage et technique	32
3/ Etablissement de la courbe de titrage	33
B - Dépouillement rationnel des courbes de dissociation	35
1/ Méthode	35
2/ Application à la dissociation des groupes COOH à 25°C.	36
3/ Dépouillement par itération des autres zones	37
4/ Tableau des résultats	40
C - Discussion des résultats	40
1/ Détermination des enthalpies apparentes d'ionisation	40
2/ Comparaison avec les données analytiques	42
3/ Interactions électrostatiques	43
D - Conclusion	47
Bibliographie	47

	Pages
CHAPITRE III - LE TITRAGE DE L'ACIDE POLYACRYLIQUE	51
A - Résultats expérimentaux	51
1/ Méthode expérimentale	51
2/ Résultats	52
B - Discussion des résultats	53
1/ Généralités	53
2/ Analyse conformationnelle de l'acide polyacrylique ...	55
3/ Interprétation des titrages d'acide polyacrylique	60
C - Conclusion	62
Bibliographie	63
CHAPITRE IV - GELATINES ESTERIFIEES	65
A - Préparation des gélamines estérifiées.....	65
1/ Données expérimentales	65
2/ Discussion des résultats analytiques	66
B - Données analytiques issues des titrages acido-basiques ..	67
1/ Les groupes carboxyle	67
2/ Les groupes imidazole	68
C - Données électrochimiques et structurales	69
1/ Point isoionique et constante de dissociation	69
2/ Variation du facteur électrostatique w et topochimie ..	69
D - Application. Combinaison de l'ion Ag^+ avec la gélamine ..	76
Bibliographie	79
CONCLUSION	81
TABLE DES MATIERES	83

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

MESURES MODERNES DE LA VITESSE DE LA LUMIERE

VU et approuvé
Montpellier, le 9 juin 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
B. CHARLES

VU et permis d'imprimer N°1224/62
Montpellier, le 12 juin 1962
Le Recteur de l'Académie de Montpellier,
G. RICHARD

IMP. LOUIS-JEAN — GAP

Dépôt légal n° 172 — 1962

